

M
E442
2006
C.1

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
Laboratorio Hormonas y Receptores,
INTA-Programa de Farmacología
Molecular y Clínica-ICBM.

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

**“EFECTO ANTINOCICEPTIVO E INTERACCIÓN SINÉRGICA DE
UN ANTAGONISTA COMPETITIVO Y UNO NO COMPETITIVO
DEL RECEPTOR NMDA EN UN MODELO DE DOLOR CRÓNICO
EN RATA”.**

JEANNETTE EMILIA ESPINOSA ARAVENA.

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO-DENTISTA.

TUTOR PRINCIPAL:
Prof. Dra. Teresa Pelissier Serrano.

TUTOR ASOCIADO:
Prof. Dr. Carlos Paeile Jacquier.

SANTIAGO - CHILE
2006

FACULTAD DE ODONTOLOGIA
BIBLIOTECA CENTRAL
AVDA. SANTA MARIA 571

7629

Quiero dedicar este trabajo a: **AGRADECIMIENTOS**

Mis padres, Carmen y Fernando, que durante toda mi vida me han entregado su amor y apoyo, han confiado en cada una de mis decisiones y me han brindado la calidez y tranquilidad de un hogar el cual esta estampado todo vuestro esfuerzo y dedicación. Gracias por ayudarme a cumplir uno de mis mayores sueños.

A mi hermana Elizabeth, por su apoyo y consejo, sobretodo en los momentos más difíciles de mi vida, por ser mi amiga constante más cercana. Además, por su confianza, ya que me ayudó activamente a terminar y aprobar la asignatura de Operatoria dental.

A mi "amorcito" Roberto, gracias por entregarme tu amor constante y sincero, por apoyarme y aconsejarme en los momentos difíciles o de confusión, donde tus palabras me brindaron claridad y tranquilidad... y por compartir a mi lado este camino hermoso que hemos ido construyendo juntos.

A mi amiga Claudia, por todo su apoyo y ayuda desinteresada, que siempre me ofreció en los momentos oportunos y de más necesidad...

Y por sobre todo, a Dios... que me ha permitido estar en este mundo y me ha dado las herramientas para luchar y salir adelante, me ha iluminado para tomar las decisiones correctas y ha hecho llegar a mi vida a aquellas personas que me han brindado su amor e invaluable ayuda, gracias por estar siempre presente...

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Teresa Pelissier, por toda su dedicación como docente, por compartir sus conocimientos y todo su tiempo en la realización de este trabajo. Por todo su apoyo y consejo como profesor guía y también como persona. Su ayuda brindada en todo este tiempo fue inestimable, gesto que le agradezco con todo el corazón.

A los Drs. Carlos Paeile Jacquier y Alejandro Hernández Kunstmann, por todo el tiempo dedicado y gran apoyo otorgado, durante el desarrollo de este trabajo de investigación.

Quiero agradecer a mis amigos, Ivonne Aránguiz Valdés y Jorge Aránguiz Valdés, por toda su ayuda y por compartir tantos momentos agradables, por el apoyo y por escucharme en innumerables ocasiones durante todos estos años.

Por último agradecer a todas aquellas personas de esta Facultad, que de una u otra forma, con su ayuda o amistad, contribuyeron a que mis años de estudios fuesen más llevaderos, en especial a: Mi amiga y compañera Patricia Palma, por tantos momentos compartidos, por tantas alegrías y tristezas que vivimos juntas. A Patricia Gana, por la amistad que hemos cultivado en estos últimos años y que espero continúe. A mi amiga, Soledad Opazo (pabellón de Odontopediatría), por su compañía, paciencia y apoyo.

Quisiera aprovechar de agradecer también, a la Sra. Patricia Gutiérrez (asistente social), a la Sra. Berta Mery y Sra. Angela Navas (Secretaría de estudios). Por último, al Sr. Juan Marchant Muñoz (guardia de seguridad).

INTRODUCCION	1
ASPECTOS TEÓRICOS	3
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	21
MATERIAL Y MÉTODOS	23
RESULTADOS	30
DISCUSIÓN	44
CONCLUSIONES	50
SUGERENCIAS	51
RESUMEN	52
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

INDICE

I. INTRODUCCIÓN

5

INTRODUCCIÓN	1
ASPECTOS TEÓRICOS	5
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	21
MATERIAL Y MÉTODOS	23
RESULTADOS	30
DISCUSIÓN	45
CONCLUSIONES	50
SUGERENCIAS	51
RESUMEN	52
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

I. INTRODUCCIÓN

El dolor constituye una modalidad sensorial cuyo rol fundamental es alertar al individuo respecto a un daño tisular real o potencial. En su condición aguda el dolor es fisiológico y beneficioso para las diversas especies animales, pero en su condición crónica el dolor es siempre patológico y debiera ser evitado mediante los procedimientos terapéuticos que se dispongan.

Al producirse un daño del tejido, de origen térmico, mecánico o químico, se activan los receptores del dolor o nociceptores, células con un umbral de activación elevado en respuesta selectiva a estímulos directa o potencialmente lesivos (nociceptivos). Los nociceptores son neuronas primarias con terminaciones periféricas en los territorios cutáneos y viscerales (1). Se han identificado dos tipos de nociceptores: (i) los A δ , fibras mielínicas de pequeño diámetro que son activadas por temperaturas extremas (menores de 5° C o mayores de 45° C) o por estímulos mecánicos como presión intensa al tejido; y (ii) los C, fibras amielínicas que son activadas por estímulos polimodales de alta intensidad, mecánicos, térmicos y químicos. Estas aferencias sinaptan en la médula espinal con las neuronas de segundo orden, las que llevarán las señales nociceptivas hasta los centros superiores (tálamo y área somestésica de la corteza cerebral). Es en el tálamo donde se produce la integración de la información nociceptiva, la que es posteriormente conducida por neuronas de tercer orden a la

corteza cerebral donde se localiza, cuantifica y se evalúa la calidad del daño producido (2).

También a nivel espinal, se producen sinapsis de las aferencias primarias o nociceptores con las motoneuronas responsables de la actividad refleja segmentaria espinal (reflejo flexor o de retirada), los que pueden ser evocados por estimulación dolorosa de la piel o tejido subcutáneo y músculo, así como por estimulación eléctrica supramáxima de los territorios cutáneos. Esta actividad motora, consiste en un reflejo polisináptico típico generado por la actividad de las fibras C aferentes, las que emiten colaterales ascendentes y descendentes que abarcan varios segmentos medulares superiores e inferiores (hasta 6) y que contactan a múltiples cadenas de interneuronas, las cuales transmitirán finalmente el impulso al órgano efector (músculo) vía neuronas eferentes motoras (2).

La transmisión sináptica excitatoria entre los nociceptores y las neuronas de segundo orden del asta dorsal de la médula espinal está mediada por diversos aminoácidos y neuropéptidos, siendo los de mayor relevancia el glutamato y la sustancia P, respectivamente. Glutamato activa los receptores de tipo AMPA (ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico), que revisten un importante significado en dolor agudo o episódico. En procesos de dolor crónico, adquiere una mayor relevancia el receptor glutamatérgico NMDA (N-metil-D-aspartato) para (3),

y el receptor NK-1 (neurokinina-1) para sustancia P, péptido que se co-libera con glutamato e induce potenciales post-sinápticos lentos (2).

Los principales mecanismos endógenos antinociceptivos se relacionan con la actividad de interneuronas del asta dorsal de la médula espinal que liberan péptidos opioides, que inhiben la transmisión sináptica entre las aferencias nociceptivas primarias y las neuronas secundarias. Intimamente relacionadas con estas neuronas opioides y jugando también un importante rol modulador inhibitorio de las aferencias, se encuentran las fibras descendentes que liberan monoaminas, principalmente noradrenalina y serotonina, y que nacen de núcleos del tronco cerebral (2).

Los reflejos segmentarios espinales mencionados anteriormente que permiten al individuo adoptar conductas de protección respecto a los estímulos nociceptivos que los generan, se utilizan frecuentemente en investigación experimental como indicadores cuantitativos de la nocicepción espinal. Del mismo modo y considerando la incesante búsqueda de nuevos fármacos con propiedades antinociceptivas, se utiliza frecuentemente este reflejo como parámetro experimental para conocer las posibles modificaciones que induce la administración intratecal de fármacos (espacio subaracnoideo, entre L5 y L6), sobre la nocicepción espinal. Además, es importante mencionar los cambios adaptativos que se generan en la conducción y/o modulación de la información dolorosa durante eventos de dolor persistente, lo que hace aún más difícil

la búsqueda de fármacos destinados a modificar la información nociceptiva y su utilización clínica permanente como fármacos efectivos.

1. Definiciones

-DOLOR-

La International Association for the Study of Pain (IASP) ha definido el dolor como: *"Una experiencia sensorial y emocional desagradable, asociada a un daño real o potencial, o asociada en términos de ese daño (1)*.

Por su parte, la American Veterinary Medical Association en el Colloquium on Recognition and Alleviation of Animal Pain and Distress, describió que: *"El dolor de carácter sensorial, emocional y emocional mixto, que*

provoca algunos cambios protectores, que resultan en evitación aprendida y que pueden modificar rasgos de conducta especie-específicas, produciendo el comportamiento de dolor"

Si bien se trata de definiciones que buscan explicar desde distintos puntos de vista la percepción humana y animal de esta modalidad sensorial, ambas incluyen elementos comunes. En efecto, estas definiciones son concordantes en mostrar el dolor como un fenómeno subjetivo e individual, de carácter eminentemente clínico y que no solo posee un componente sensitivo desagradable, sino que también muestra un componente emocional negativo (distrés).

I. ASPECTOS TEÓRICOS

1. Definiciones

- DOLOR:

La International Association for the Study of Pain (IASP) ha definido el dolor como: *“Una experiencia sensorial y emocional desagradable, asociada a un daño tisular existente o potencial, o descrita en términos de ese daño (1).*

Por su parte, la American Veterinary Medicine Association en el Colloquium on Recognition and Alleviation of Animal Pain and Distress, concluyó que: *“El dolor en animales es una experiencia sensorial y emocional aversiva, que*

evoca acciones motoras protectoras, que resultan en evitación aprendida y que pueden modificar rasgos de conducta especie-específicos, incluyendo el comportamiento social”.

Si bien se trata de definiciones que buscan explicar desde distintos puntos de vista la percepción humana y animal de esta modalidad sensorial, ambas muestran elementos comunes. En efecto, estas definiciones son concordantes en mostrar al dolor como un fenómeno subjetivo e individual, de carácter eminentemente clínico y que no sólo posee un componente sensitivo desagradable, sino que también muestra un componente emocional negativo (distrés).

- NOCICEPCIÓN:

Es la respuesta neural que aparece tras la injuria tisular. Implica la transmisión y procesamiento de la información sensorial relacionada a la injuria y sus respuestas reflejas medibles. Este término se utiliza preferentemente para referirse a situaciones experimentales, donde el estudio de conductas estereotipadas o de respuestas reflejas sólo permite estimar la magnitud del componente senso-discriminativo del dolor, pero no del componente afectivo-emotivo presente en el dolor verdadero (4).

- ANALGESIA:

Es la ausencia o bien la reducción del dolor percibido (5).

- ANTINOCICEPCIÓN:

Es la abolición de las respuestas reflejas y conductuales evocadas por la aplicación de estímulos nocivos. Puede entenderse entonces que analgesia y antinocicepción son fenómenos distintos, originados a partir de una interferencia sobre el procesamiento de la información nociceptiva, pero que no necesariamente operan de la misma manera sobre la percepción afectiva y sensitiva final del estímulo nocivo.

- TIPOS DE DOLOR

La clasificación de los tipos de dolor y síndromes dolorosos es materia de debate entre científicos y clínicos, sin embargo hay concordancia en que los tipos de dolor pueden ser clasificados de acuerdo a una nomenclatura basada en:

1. Su origen anatómico

a) **DOLOR NOCICEPTIVO SOMÁTICO**: aparece luego de la estimulación nociva de la piel (dolor superficial); o de tejido conectivo, músculo, huesos y membranas sinoviales (dolor profundo) (1,3). Este tipo de dolor es percibido como una sensación desagradable, intensa y bien localizada.

b) **DOLOR NOCICEPTIVO VISCERAL**: se origina por una estimulación nociva de vísceras contenidas en las cavidades craneana, torácica, abdominal y pélvica, siendo usualmente poco localizado y acompañado de reflejos autónomos y somáticos (1).

c) **DOLOR NEUROGÉNICO**: nace en el sistema nervioso periférico por injuria o irritación de una rama nerviosa o aquel que deriva de daño o enfermedad en el SNC.

2. Sus características clínicas

a) **DOLOR AGUDO o FISIOLÓGICO**: es un fenómeno de carácter transitorio, generalmente inferior a tres meses, que está asociado con daño tisular real o potencial y que es útil para el resguardo de la integridad del organismo (1,2,3). En el dolor agudo o fisiológico se distinguen dos modalidades de percepción: la primera o **dolor fásico**, tiene una duración de segundos y aparece inmediatamente luego de la

aplicación del estímulo nocivo. Sus características cualitativas dependen del tipo de estímulo, siendo además de una magnitud que guarda relación con el daño que lo origina (3). A esta respuesta se le considera de un alto valor adaptativo ya que es capaz de prevenir un daño, toda vez que evoca respuestas de evitación y escape. El contacto de la piel con una superficie caliente y las respuestas que este acto evoca, son un ejemplo de este tipo de dolor. La segunda modalidad de dolor agudo fisiológico, o **dolor tónico o persistente**, aparece en un período más posterior a la aplicación del estímulo nocivo y es de carácter prolongado: normalmente tiene una duración de horas a días y su percepción se termina al mismo tiempo que se resuelve la causa que lo motiva.

b) **DOLOR CRÓNICO o PATOLÓGICO**: es aquel de duración prolongada, generalmente mayor a tres meses, no necesariamente está asociado con daño tisular y se considera que es una forma de activación patológica del sistema nociceptivo y que puede presentar variaciones de intensidad incluso durante un mismo día.

3. Su Intensidad

La intensidad del dolor es la dimensión más sobresaliente de él y por ser tan subjetiva se han desarrollado innumerables procedimientos para medirlo. Los instrumentos más frecuentemente utilizados son las escalas de intensidad de dolor que miden únicamente el aspecto de intensidad de la experiencia dolorosa. Entre ellas tenemos la Escala de categoría verbal (ECV), Escala de categoría numérica (ECN),

Escala análoga visual (VAS del término en inglés *Visual Analog Scale*) que es una de las más utilizadas, Escala de categoría gráfica (ECG), Cuestionario del dolor de McGill, entre otras (1). En general, todas ellas son simples, fáciles de usar y comprender, de bajo costo, y califican el dolor en:

- a) Leve
- b) Moderado
- c) Intenso
- d) Insoportable

2. Vías del dolor

El término dolor es utilizado para designar experiencias muy variadas, que abarcan desde aquellas obtenidas en condiciones experimentales en individuos sanos, hasta las observadas en condiciones patológicas tanto agudas como crónicas. Es por lo tanto necesario detenerse a describir algunos aspectos de la fisiopatología del dolor, es decir, cómo se genera, cómo se conduce, dónde se percibe, así como las sustancias que se encuentran involucradas en su generación y conducción.

El procesamiento de la información nociceptiva permite la percepción del dolor y la activación de numerosas respuestas, lo que incluye emociones, reflejos somáticos y autónomos, respuestas endocrinas, aprendizaje y memoria. Para llevar a cabo estas funciones, el sistema nociceptivo emplea circuitos neuronales que operan como arcos

reflejos en los que pueden distinguirse receptores, vías aferentes, centros elaboradores de la información y vías eferentes asociadas a efectores (Fig. 1).

El dolor se inicia en territorios periféricos, por estimulación de terminaciones nerviosas libres. Las terminaciones encapsuladas, como las de tacto y temperatura, sólo pueden producirlo en condiciones patológicas, por ejemplo en neuropatías periféricas. El estímulo, que puede ser físico, químico, bacteriano o traumático, desencadena la liberación de mediadores químicos que van a producir la despolarización de la terminación libre, señal que se propagará a través del axón o fibra de la primera neurona de la vía del dolor. Entre los mediadores que se liberan están las aminas biógenas como la histamina, polipéptidos como la bradicinina y lípidos como las prostaglandinas, más una serie de otros mediadores.

La primera neurona de la vía aferente del dolor es una neurona en T que tiene su soma en el ganglio espinal. Estas neuronas reciben la información nociceptiva mediante dos tipos de fibras periféricas: las fibras A δ , que poseen una delgada vaina de mielina, y una velocidad de conducción de 4 a 30 m/seg. y las fibras C, que son amielínicas y además conducen a una velocidad mucho menor que oscila entre los 0,4 a 2 m/seg. Esto se traduce en que frente a una misma injuria, el dolor será conducido simultáneamente mediante fibras rápidas A δ y fibras lentas C, lo que implica que la percepción superior

se realizará en duplicado, en dos momentos diferentes; esto es lo que relatan los superiores. SI-SII áreas somestésicas e parietales secundarias (2). (Adaptada del libro El Dolor, C. Paolic y N. Bilbeny, 2005).

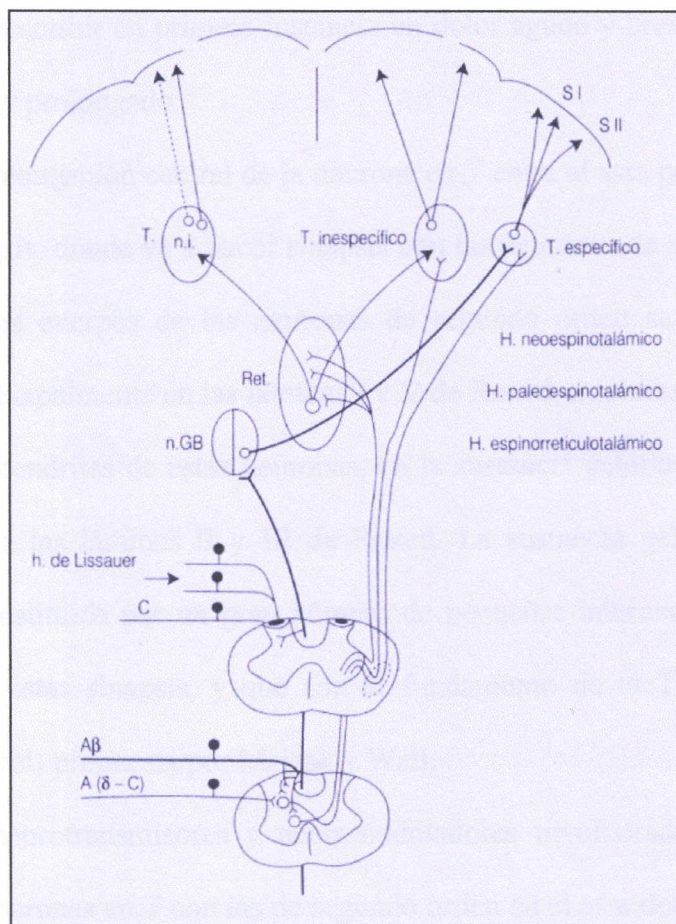


Figura 1

Esquema de las vías del dolor. Haces ascendentes e ingreso de las fibras $A\alpha$, β , $A\delta$ y C al asta posterior. Sinapsis del haz espinoreticulotalámico con la reticular (Ret). Núcleos talámicos inespecíficos (T.n.i.). Núcleos talámicos específicos (T.e.). Núcleos *gracilis* (sensibilidad epicrítica extremidad inferior) y *cuneatus* (sensibilidad epicrítica miembro superior). SI-SII áreas somestésicas o parietales ascendentes (2). (Adaptado del libro El Dolor; C. Paeile y N. Bilbeny, 2005).

pacientes al describir en primera instancia un dolor agudo y breve, y luego la aparición de uno sordo y prolongado.

La prolongación central de la neurona en T entra al asta posterior de la médula, a la sustancia gris, donde va a hacer sinapsis con las neuronas de segundo orden de la vía del dolor. Los cuerpos de las neuronas de segundo orden se encuentran en el asta posterior, principalmente en las láminas I y V de Rexed, mientras que las sinapsis tienen lugar en las dendritas de estas neuronas, en la sustancia gelatinosa de Rolando, lo que corresponde a las láminas II y III de Rexed. La sustancia gelatinosa de Rolando se encuentra constituida por un gran número de pequeñas interneuronas, que modulan la actividad en estas sinapsis, y que son el fundamento de la Teoría de la Compuerta (o Gate Control) propuesta por Melzak y Wall.

Los neurotransmisores y neuromoduladores involucrados en las sinapsis que forman las neuronas en T con las de segundo orden en el asta dorsal son múltiples, entre ellos la sustancia P y el ácido glutámico. Asimismo, también son múltiples los mediadores liberados por las interneuronas que modulan la actividad a nivel de las neuronas espinales de segundo orden, tales como GABA y péptidos opioides, generando un verdadero filtro del estímulo doloroso que es puesto en marcha por la activación de los receptores respectivos (gabaérgicos, opiopeptidérgicos), conocido como **control segmentario del dolor**. Debemos mencionar que las fibras sensoriales no nociceptivas A β (táctiles, propioceptivas, etc.) que entran al asta posterior, a la sustancia blanca y

siguen por ella para ir a formar los cordones posteriores o fascículos *gracilis* y *cuneatus*, en su recorrido emiten colaterales que sinaptan con las neuronas de la sustancia gelatinosa, contribuyendo así al control segmentario del dolor.

Los axones de la segunda neurona del dolor dan origen al sistema anterolateral, que lleva la información dolorosa al cerebro a través de dos haces:

- Haz neoespinotalámico, que asciende a los núcleos específicos del tálamo: núcleo ventroposterolateral (sensibilidad corporal) y núcleo ventroposteromedial (sensibilidad de la cara); desde ahí las fibras ascienden a la corteza, a un área precisa involucrada en la localización del dolor, esto es la zona donde se está produciendo la injuria.

- Haz paleoespinotalámico, que a diferencia del anterior se proyecta primeramente a la formación reticular, y desde allí a núcleos talámicos inespecíficos, lo que genera una proyección difusa hacia la corteza, especialmente la corteza frontal, involucrada en la ponderación cuantitativa del dolor, vale decir, cuánto nos duele. Durante su paso por la formación reticular, la información dolorosa activa neuronas de los núcleos del Rafe que contribuyen al control suprasegmentario del dolor, con neuronas hipotalámicas involucradas en la respuesta visceral al dolor, así como con neuronas que proyectan al sistema límbico, lo cual otorga el componente emotivo del dolor; lo que explicaría el por qué dolores de intensidad semejante puedan ser ponderados o codificados en forma muy diferente de un individuo a otro, e incluso en el mismo sujeto de un momento a otro.

Además de las vías ascendentes del dolor existe un sistema de control descendente que es gatillado desde la corteza a la formación reticular, sustancia gris periacueductal y núcleos del Rafe. Las vías de control descendente son principalmente noradrenérgicas y serotoninérgicas, y se conocen como **control suprasegmentario del dolor** (corresponde a la analgesia que puede lograrse por ejercicios físicos, por ejemplo respiratorios o psíquicos, así como por estrés) (2).

3. Fármacos utilizados en el presente estudio

a) CAPSAICINA

Es el constituyente activo de una gran variedad de ajíes (*Capsicum sp.*), y corresponde a una familia de irritantes naturales, los vaniloides, los que después de producir una sensación inicial de quemadura, en general tienen propiedades analgésicas y antiinflamatorias (6). En el hombre, la administración intradérmica de capsaicina provoca además de la sensación de quemadura, una hiperalgesia térmica y mecánica.

La acción sensibilizadora de la capsaicina es mantenida por modificaciones de la excitabilidad de las fibras aferentes primarias, las cuales disminuyen su umbral de excitabilidad ante estímulos térmicos, mecánicos o nociceptivos. Se produce aumento de la amplitud y duración de la respuesta ante estos estímulos, sensibilización de neuronas nociceptivas centrales, y sensibilización de los "nociceptores silentes" que son aquellas neuronas que no responden al estado normal y que se sólo se activan en dolores muy intensos y/o crónicos.

Además de las vías ascendentes del dolor existe un sistema de control descendente que es gatillado desde la corteza a la formación reticular, sustancia gris periacueductal y núcleos del Rafe. Las vías de control descendente son principalmente noradrenérgicas y serotoninérgicas, y se conocen como **control suprasegmentario del dolor** (corresponde a la analgesia que puede lograrse por ejercicios físicos, por ejemplo respiratorios o psíquicos, así como por estrés) (2).

3. Fármacos utilizados en el presente estudio

a) CAPSAICINA

Es el constituyente activo de una gran variedad de ajíes (*Capsicum sp.*), y corresponde a una familia de irritantes naturales, los vaniloides, los que después de producir una sensación inicial de quemadura, en general tienen propiedades analgésicas y antiinflamatorias (6). En el hombre, la administración intradérmica de capsaicina provoca además de la sensación de quemadura, una hiperalgesia térmica y mecánica.

La acción sensibilizadora de la capsaicina es mantenida por modificaciones de la excitabilidad de las fibras aferentes primarias, las cuales disminuyen su umbral de excitabilidad ante estímulos térmicos, mecánicos o nociceptivos. Se produce aumento de la amplitud y duración de la respuesta ante estos estímulos, sensibilización de neuronas nociceptivas centrales, y sensibilización de los “nociceptores silentes” que son aquellas neuronas que no responden al estado normal y que se sólo se activan en dolores muy intensos y/o crónicos.

En los tejidos periféricos la capsaicina provoca, por acción antidrómica, la liberación de mediadores inflamatorios en regiones adyacentes, y es por lo tanto capaz de producir inflamación neurogénica. Trabajos experimentales sobre este tipo de inflamación frecuentemente emplean capsaicina, ya que este agente al unirse periféricamente a receptores vaniloides (VR1) induce la liberación antidrómica de sustancia P, así como del péptido relacionado con el gen de la calcitonina, de glutamato y probablemente de otros mediadores desde las terminaciones libres, emulando este tipo de inflamación (3). La sustancia P es capaz de inducir vasodilatación y extravasación de plasma, como también el péptido relacionado con el gen de la calcitonina es un potente vasodilatador. Una contribución aparte para la extravasación de plasma la producen los mastocitos a través de la liberación de histamina y serotonina. Por otra parte, las neuronas simpáticas postganglionares aportan prostaglandinas, neuropéptido Y, purinas y noradrenalina (7,8).

La capsaicina tiene una acción dual. Por una parte, posee la acción pronociceptiva sensibilizadora anteriormente descrita, y por otra parte una acción desensibilizadora, ya que la aplicación de dosis débiles repetidas de capsaicina o la administración de una dosis alta de esta sustancia provoca una desaparición de las sensaciones iniciales de quemadura y un aumento significativo del umbral de detección de las sensaciones dolorosas desencadenadas por irritantes químicos y térmicos. La capsaicina tiene por lo tanto una acción analgésica tardía donde la duración y la potencia

dependen de la dosis, lo que ha sido utilizado en clínica en diferentes dolores neuropáticos, especialmente en neuralgia post herpética, con resultados contradictorios (6).

b) ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR NMDA: Ketamina y (\pm) CPP (Acido 3-(2-carboxipiperazin-4)propil 1-fosfónico)

El receptor NMDA (Fig. 2) está formado por 4 subunidades diferentes. El receptor NMDA, como un conjunto, puede ser funcionalmente modulado por ligandos que actúan en diversos sitios del receptor (9,10): (i) Sitio extracelular de reconocimiento del neurotransmisor (glutamato), el cual puede ser bloqueado por antagonistas competitivos tales como CPP, dando como resultado un bloqueo de la corriente de calcio y por lo tanto del proceso de transducción intracelular. (ii) Sitio para fenciclidina (PCP) situado dentro del canal del receptor, el cual une ligandos tales como ketamina, lo que resulta en antagonismo no-competitivo de la funcionalidad del receptor NMDA. (iii) Sitio extracelular para glicina (ligando que se une a un sitio de glicina insensible a estricnina y que es esencial para la funcionalidad del receptor), el cual puede ser antagonizado por ácido quinurénico. (iv) Sitio extracelular para poliaminas (las que también modulan la funcionalidad del receptor), el cual puede ser antagonizado por ifenprodilo, bloqueando no competitivamente la funcionalidad del receptor al interactuar con la subunidad NR2B, una de las 4 subunidades que componen el receptor.

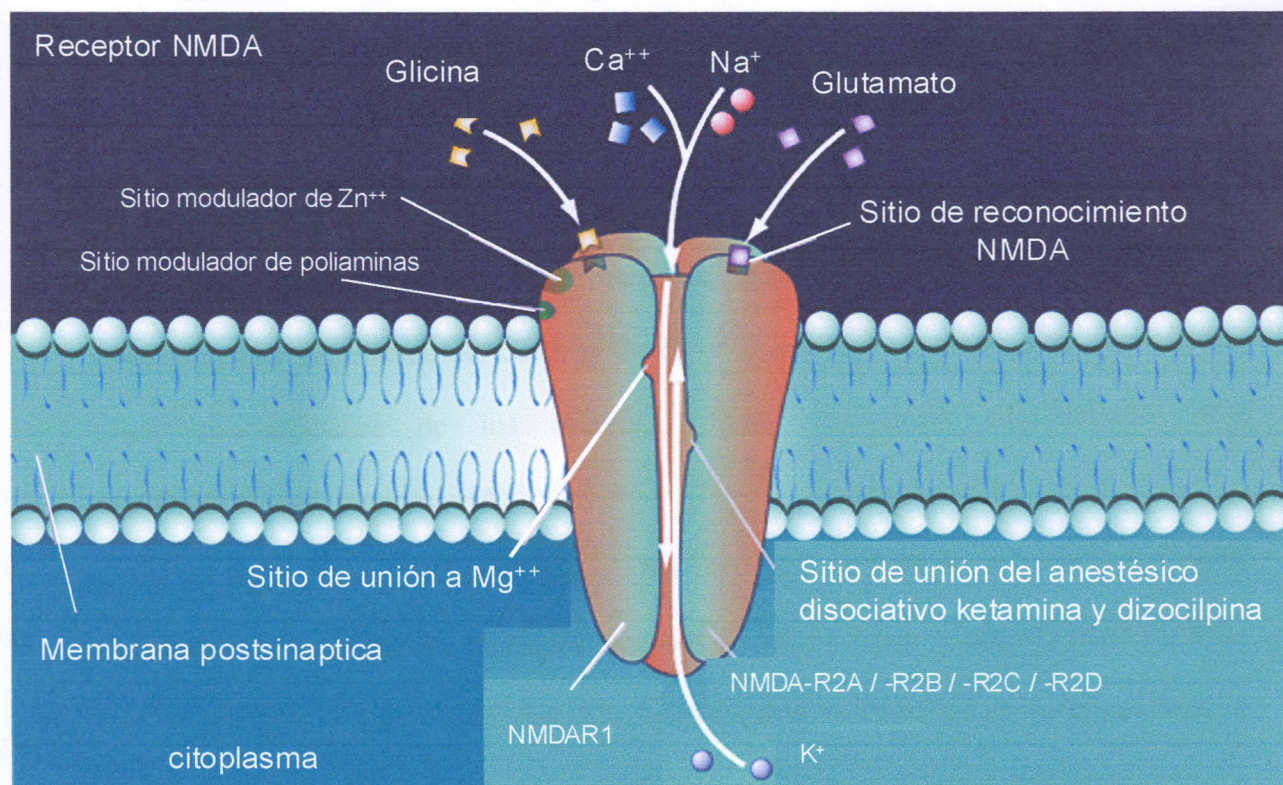


Figura 2

Representación esquemática del receptor NMDA

Es un receptor ionotrópico para glutamato cuyo nombre proviene de su agonista, el NMDA (N-metil-d-aspartato) (11).

Estudios clínicos muestran que muchos antagonistas no competitivos y competitivos del receptor NMDA, ya ensayados clínicamente o en desarrollo, pueden tener utilidad frente a diversos cuadros de dolor crónico (12,13). Sin embargo, la mayoría de estos estudios indican que tales tratamientos no están exentos de reacciones adversas psicodislépticas, muchas veces de gran severidad, lo que impide su administración continuada en cuadros de dolor crónico, reservándose su uso clínico como co-analgésicos de los opioides, donde las dosis administradas son significativamente menores (14).

El hecho que el receptor NMDA por una parte cumple un rol primordial en la sensibilización central subyacente a los procesos de dolor crónico, y por otra parte presenta a lo menos cuatro sitios de modulación útiles para el bloqueo de su funcionalidad, lo convierte en un blanco preferencial para ensayar la estrategia de combinaciones de fármacos que actúan en sitios diferentes del receptor. En esta estrategia se potencia el efecto deseado, y por otra parte se minimiza los efectos colaterales, mediante la utilización de dosis pequeñas para cada uno de los fármacos empleados. Uno de los fármacos más utilizados para el bloqueo del receptor NMDA es ketamina, antagonista no competitivo del sitio para fenciclidina situado dentro del canal del receptor. Menos estudiados han sido los antagonistas competitivos del receptor NMDA, como (\pm) CPP, bloqueador del sitio extracelular de reconocimiento del neurotransmisor, por lo que parece razonable utilizar esta combinación en modelos de dolor persistente o crónico.

- KETAMINA: Es un derivado del psicomimético fenciclidina, que se comporta como anestésico general de acción corta. La acción anestésica de la ketamina se caracteriza por un estado similar al cataléptico, con pérdida de conciencia, inmovilidad, amnesia y analgesia, que se ha denominado *anestesia disociativa*. A pesar que se conoce hace ya varios años que la ketamina es antagonista del receptor NMDA (15,16), el rol de este receptor en la nocicepción es un descubrimiento más reciente (17,18). Debido a esto último, no fue sino hasta hace poco tiempo que los efectos antinociceptivos de este fármaco fueron explotados usando ketamina en dosis subanestésicas, especialmente para el manejo de ciertos tipos de dolor. Existen evidencias que en el dolor crónico la ketamina, por cualquier vía de administración, presenta significativos efectos sinérgicos con opioides, anestésicos locales, y una variedad de otros fármacos (17,19,20). La ketamina se administra por vía endovenosa o intramuscular. Por su elevada liposolubilidad pasa con rapidez a los órganos más irrigados, incluido el cerebro, donde alcanza elevadas concentraciones en los primeros minutos post inyección. Se metaboliza en el hígado, eliminándose por la orina en forma inalterada sólo en un 4%.

- (\pm) CPP: es uno de los más potentes inhibidores competitivos del receptor y posee enantiómeros D y L, (21). Frente a la estimulación repetida de fibras de pequeño calibre en la médula espinal se produce un aumento progresivo en la descarga del potencial de acción; el (\pm) CPP no modifica la línea base pero reduce la facilitación del reflejo flexor producido por una estimulación eléctrica repetitiva o por la aplicación de aceite de

mostaza que es un irritante químico. Esto indica nuevamente su efecto antagonista del receptor NMDA, ya que es este receptor el que está involucrado en la inducción y mantención de la sensibilización central. La sensibilización central, como ya se ha dicho, participa en la hipersensibilización de los estados de dolor crónico o persistente, por lo tanto, el (\pm) CPP al ser un antagonista NMDA, se podría potencialmente usar en analgesia (22).

2. Objetivos Generales

Estudiar la acción antinociceptiva de antagonistas competitivos y no competitivos del receptor NMDA y la posible interacción entre ellos, en ratas normales y con dolor crónico monoarticular, mediante el test de administración de capsaicina en la extremidad inferior.

3. Objetivos Específicos

3.1. Evaluar en ratas normales y monoarticulares el efecto antinociceptivo de diferentes dosis intratecales de ketamina, antagonista no competitivo del receptor NMDA, utilizando el test de la capsaicina en la extremidad inferior de la rat.

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. Hipótesis:

La administración de fármacos antagonistas de distintos sitios de modulación del receptor NMDA produce efectos antinociceptivos sinérgicos en ratas con dolor crónico monoartrítico en el test de la capsaicina.

2. Objetivos Generales

Estudiar la acción antinociceptiva de antagonistas competitivos y no competitivos del receptor NMDA y la posible interacción entre ellos, en ratas normales y con dolor crónico monoartrítico, mediante el test de administración de capsaicina en la extremidad inferior.

3. Objetivos Específicos

3.1. Evaluar en ratas normales y monoartríticas el efecto antinociceptivo de diferentes dosis intratecales de ketamina, antagonista no competitivo del receptor NMDA, utilizando el test de la capsaicina en la extremidad inferior de la rata.

3.2. Evaluar en ratas normales y monoartríticas el efecto antinociceptivo de diferentes dosis intratecales de (\pm) CPP, antagonista competitivo del receptor NMDA, utilizando el test de la capsaicina en la extremidad inferior de la rata.

3.3. Obtener la dosis efectiva 50 (DE_{50}) de cada fármaco a partir de la respectiva curva de relación dosis-efecto.

3.4. Evaluar en ratas normales y monoartríticas el efecto antinociceptivo de diferentes dosis intratecales de la asociación ketamina/(\pm) CPP, utilizando el test de la capsaicina en la extremidad inferior de la rata, y determinar la DE_{50} de la asociación.

3.5. Comparar entre si los efectos antinociceptivos de ketamina, (\pm) CPP, y de la asociación ketamina/(\pm) CPP, mediante un análisis isoblográfico, en ratas normales y monoartríticas.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales

Los experimentos se realizaron en ratas machos adultas de la cepa Sprague-Dawley, normales y monoartríticas, de 250 a 350 gramos (criadas con un régimen de luz de 12 hrs por día y alimentadas a base de alimento comercial para ratas (*Champion*[®]) y agua ad-libitum. En resguardo del bienestar de los animales usados en este trabajo se aplicaron rigurosamente las normas éticas de experimentación animal estipuladas por la International Association for the Study of Pain. Esto especialmente en lo que se refiere a utilizar un número mínimo de animales, emplear cada animal en un solo experimento, no prolongar excesivamente el ensayo algésimétrico y sacrificar los animales de forma humanitaria inmediatamente después del ensayo, para lo que se administró un anestésico general en sobredosis (10 g/kg de uretano i.v.).

2. Preparación del Adyuvante de Freund (utilizado en la inducción del cuadro monoartrítico)

Se mezclan 6 ml de aceite mineral, 4 ml de cloruro de sodio 0.9% y 1 ml Tween 80; se agitan por 5 min. y luego se añaden 60 mg de restos liofilizados de *Mycobacterium butiricum* sin dejar de agitar, de acuerdo al protocolo descrito por Butler *et al.* (23). Posteriormente esta mezcla se autoclava a 120° C por 20 min. y se guarda a

temperatura ambiente hasta su uso. Previamente a la inyección se debe homogeneizar la solución, manteniendo una agitación continua.

3. Inducción del Cuadro Monoartrítico

En la mitad de los grupos experimentales se utilizaron ratas con una artritis inducida según la técnica indicada por Butler *et al.* (23). Esta técnica emplea ratas que han alcanzado dos meses de edad o 150 g de peso, siendo en este momento inoculadas en su articulación tibiotarsiana derecha con un volumen de 50 μ l adyuvante completo de Freund, el cual contiene 300 μ g de *Mycobacterium butiricum*. Tal procedimiento produce un cuadro artrítico localizado que se torna estable entre las 2 y 6 semanas post-inoculación. En este trabajo se utilizaron las ratas con artritis inducida una vez que completaron 4 semanas luego de la administración del adyuvante.

4. Test Algesimétrico

Los experimentos se realizaron en una pieza tranquila, sin ruido ambiente, con luz de mediana intensidad, entre las 10:00 y las 16:00 horas, a una temperatura ambiente de 20 - 24 ° C en una caja de plexiglass. Las dimensiones de la caja de plexiglass en las que se mantuvo cada rata fue de 30 x 30 x 30 cm. con espejo por cuatro lados (paredes y piso) para poder observar la conducta del animal. Cada animal fue puesto en la caja por 10 minutos antes de comenzar el experimento con el fin de

minimizar el estrés. Las ratas no tuvieron acceso ni a alimento ni agua durante el experimento. Luego fueron inyectadas en forma intratecal, entre las vértebras lumbares 5 y 6 (L5 y L6), con el fármaco en estudio y reintroducidas en la caja de plexiglass. 5 minutos después las ratas recibieron 1.5 μg de capsaicina por vía intraplantar en un volumen de 25 μl en la extremidad inferior derecha. La capsaicina fue disuelta en *Endolipide*[®], un compuesto para alimentación parenteral que permite su disolución y que permanezca por un tiempo prolongado en el sitio de inyección. Se usó una jeringa Hamilton con una aguja de masoterapia de 4 x 4 mm para la inyección de la capsaicina. Luego de la inyección de capsaicina se inicia el periodo de observación. El comportamiento del animal fue filmado mediante una cámara de video durante 45 minutos y luego se analizó el video donde se contaron los segundos en que el animal mostraba una conducta nociceptiva. Esta conducta consistía en la mantención en alto de la pata inyectada, y/o lamido de la extremidad y/o grataje (rascado) con dicha pata. El tiempo total de estas conductas, expresado en segundos, permitió construir curvas con los resultados y compararlos entre sí.

5. Protocolo:

A fin de estandarizar la experimentación, se siguió día a día un riguroso protocolo de acción, con el objetivo de minimizar los errores en relación al operador: a) Preparar las soluciones en estudio o retirar las soluciones ya preparadas desde el

refrigerador a fin de que se encuentren a T° ambiente, y poner la capsaicina sobre el vortex para homogeneizarla. b) Llenar las jeringas con la cantidad correcta de fármaco a utilizar. c) Acondicionar la sala de experimentación a una T° de entre 20 y 24° C sostenida durante el tiempo que dure la experimentación. d) Limpiar los espejos de las cajas de plexiglass entre experimentos, poner el reloj en posición, chequear la visibilidad, anotar el título del experimento (fármaco, concentración y n° de rata) en un lugar visible de cada caja. e) Encender los equipos de grabación y chequear su correcto funcionamiento. f) Al finalizar dejar todo como al inicio del experimento.

Luego se analizan los videos y se anotan los resultados correspondientes.

6. Administración de fármacos

Los fármacos utilizados fueron:

- Capsaicina, Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.
- *Endolipide*®, Laboratorio B. Braun, Francia.
- Ketamina: *Imalgene 1000*®, Laboratorio Rodia Merieux de Chile.
- (±) CPP, Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.

7. Grupos Experimentales

Los fármacos se administraron diluidos en cloruro de sodio al 0,9%. La administración intratecal se realizó directamente, mediante una inyección transcutánea en el espacio intervertebral entre la quinta y sexta vértebras lumbares, según la técnica

descrita por Mestre *et al.* (24) (Fig. 3)

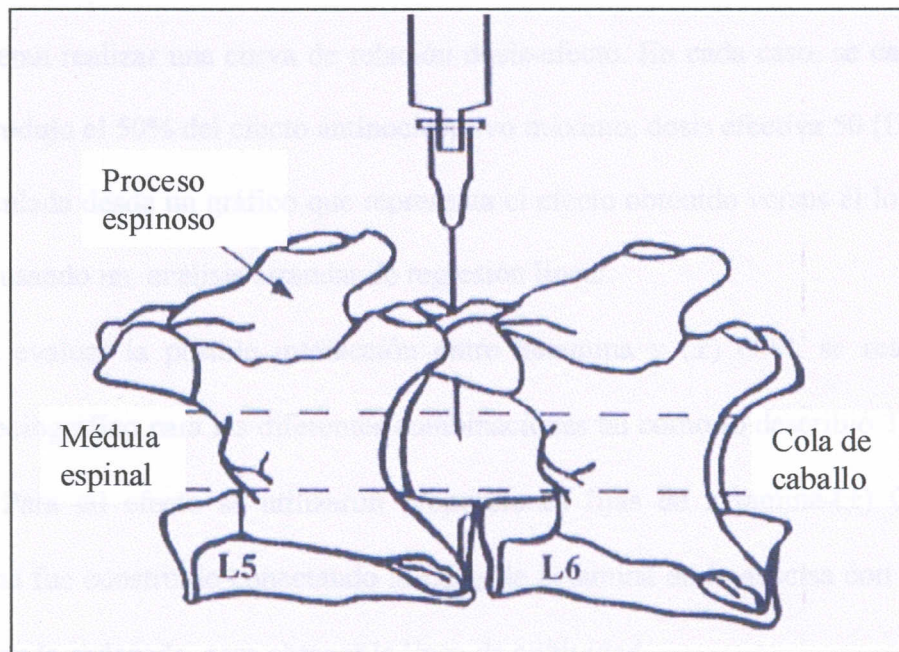


Figura 3

Técnica de administración intratecal de fármacos entre las vértebras lumbares 5 y 6 (L5 y L6) (24).

7. Grupos Experimentales

Los grupos experimentales, normales y monoartríticos, estuvieron constituidos a lo menos por 4 animales para cada dosis de fármaco estudiada.

Las dosis de ketamina y (\pm) CPP empleadas fueron escogidas considerando los

efectos obtenidos en trabajos similares, buscando magnitudes de efecto antinociceptivo que permitieran realizar una curva de relación dosis-efecto. En cada caso, se calculó la dosis que produjo el 50% del efecto antinociceptivo máximo, dosis efectiva 50 (DE_{50}), la que fue calculada desde un gráfico que representa el efecto obtenido versus el logaritmo de la dosis, usando un análisis estándar de regresión lineal.

Para evaluar la posible interacción entre ketamina y (\pm) CPP, se realizó un análisis isoblográfico para las diferentes combinaciones tal como lo describió Tallarida et al (25). Para tal efecto se utilizaron proporciones fijas de ketamina-(\pm) CPP. El isoblograma fue construido conectando la DE_{50} de ketamina en la abscisa con la DE_{50} de (\pm) CPP en la ordenada para obtener la línea de aditividad.

Para cada combinación de fármacos, la DE_{50} y su intervalo de confianza asociado fue determinado mediante un análisis de regresión lineal de la curva dosis-respuesta (para 4 dosis) y comparados mediante un t-test a una DE_{50} de adición teórica obtenida a través del cálculo: $DE_{50} \text{ add} = DE_{50} \text{ fármaco A} (P1 + R * P2)$, donde R es la relación de potencia del fármaco A (sólo ketamina) al fármaco B (sólo (\pm) CPP), P1 es la proporción de fármaco A, y P2 es la proporción del fármaco B en la mezcla total. En el presente estudio, las proporciones en relación fija fueron seleccionadas mediante una primera combinación de dosis con la DE_{50} de A y B y luego 1/2, 1/8 o 1/32 de la DE_{50} , obtenida en las ratas monoartríticas, con lo cual se construyó la curva dosis-respuesta de la asociación.

Los resultados se expresaron en porcentaje del efecto antinociceptivo \pm el error estándar de la media (SEM). El porcentaje de antinocicepción se calculó basándose en la siguiente fórmula:

$$\% \text{ efecto antinociceptivo} = 100 - \left(\frac{\text{Resultado experimental}}{\text{Resultado control}} \times 100 \right)$$

Grupos de Ratas:

- Control: Cloruro de Sodio al 0.9%
- Ketamina: 0.1, 0.3, 1.0, 5.0, 10.0, 15.0 y 30.0 $\mu\text{g/rata}$
- (\pm) CPP: 0.125, 2.5, 7.5, 12.5 y 25.0 $\mu\text{g/rata}$
- Ketamina/(\pm) CPP: 0.029/0.023, 0.116/0.091, 0.463/0.366 y 0.926/0.731 $\mu\text{g/rata}$

8. Expresión de Resultados

Los resultados se expresaron como la media \pm SEM, para grupos de animales con un n entre 4 y 8 cada uno. Los datos fueron analizados utilizando análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido del test de Tukey-Kramer para comparaciones múltiples entre grupos. Para todos los resultados el nivel de significancia se estableció en $p < 0.05$ y se graficó de la siguiente forma: $p < 0.05 = *$, $p < 0.01 = **$ y $p < 0.001 = ***$.

VI. RESULTADOS

1. Efecto de la administración de cloruro de sodio intratecal

En la rata normal, la administración intratecal de cloruro de sodio al 0.9%, 5 minutos antes de la inyección de capsaicina (1.5 μg), dio lugar a una respuesta nociceptiva de 1479 ± 76 seg. ($n=6$), lo que representa un porcentaje de disminución de 0.28 ± 5.16 % en relación a capsaicina sin fármacos, la que no fue estadísticamente significativa (Fig. 4A y 5A). Esta misma administración de cloruro de sodio al 0.9%, en la rata monoatritica, produjo una respuesta nociceptiva de 1713 ± 105 seg. ($n=6$), lo que representa un porcentaje de disminución no significativo de 4.58 ± 5.86 % en relación a capsaicina sin fármacos (Fig. 4B y 5B).

2. Efecto antinociceptivo de ketamina intratecal

En la rata normal, la administración intratecal de ketamina 5 minutos antes de la inyección de capsaicina (1.5 μg) produjo una disminución dosis-dependiente de la respuesta nociceptiva. La disminución de la amplitud de esta respuesta con la dosis de 0.3 $\mu\text{g}/\text{rata}$ fue de 13.11 ± 1.10 % ($n=6$), la que no fue significativamente diferente al control con suero. La dosis de 1.0 $\mu\text{g}/\text{rata}$ disminuyó la respuesta en 32.25 ± 3.57 % ($n=6$) ($p < 0.01$) significativamente diferente a la administración de suero en las mismas condiciones. Las dosis de 5.0, 10.0, 15.0 y 30.0 $\mu\text{g}/\text{rata}$ produjeron

una disminución de 53.98 ± 5.23 % ($n = 6$) ($p < 0.001$), 50.26 ± 10.59 % ($n = 6$) ($p < 0.001$), 56.16 ± 5.17 % ($n = 4$) ($p < 0.001$), y 90.01 ± 2.97 % ($n = 6$) ($p < 0.001$) respectivamente, disminuciones que fueron **significativas respecto al control**. (Fig. 4A y 5A). Se calculó la dosis efectiva 50 (DE_{50}), la que fue de 4.374 $\mu\text{g/rata}$ con un intervalo de confianza al 95% entre 2.9381 y 6.5102 (Fig. 6A).

En la rata monoatrítica, la administración intratecal de ketamina en las mismas condiciones produjo una disminución dosis-dependiente de la respuesta nociceptiva. La disminución de la amplitud de esta respuesta con la dosis de 0.1 $\mu\text{g/rata}$ fue de 23.22 ± 6.53 % ($n = 4$), la que no fue **significativamente diferente al control con suero**. La dosis de 1.0 $\mu\text{g/rata}$ disminuyó la respuesta en 48.20 ± 10.37 % ($n = 4$) ($p < 0.01$), **significativamente diferente al de la administración de suero en las mismas condiciones**. Las dosis de 10.0 y 30.0 $\mu\text{g/rata}$ produjeron una disminución de 85.38 ± 4.48 % ($n = 4$) ($p < 0.001$) y 88.51 ± 2.83 % ($n = 4$) ($p < 0.001$) respectivamente, disminuciones que fueron **significativas respecto al control** (Fig. 4B y 5B). Se calculó la DE_{50} la que fue de 0.926 $\mu\text{g/rata}$ con un intervalo de confianza al 95% entre 0.5180 y 1.6549 (Fig. 6B).

3. Efecto antinociceptivo de (\pm) CPP

En la rata normal, la administración intratecal de (\pm) CPP 5 minutos antes de la capsaicina (1.5 μg) produjo una disminución dosis-dependiente de la respuesta nociceptiva. La dosis de 2.5 $\mu\text{g/rata}$ de (\pm) CPP produjo una **disminución de efecto de**

14.84 ± 7.03 % (n = 6) que no fue significativamente diferente del control. La dosis de 7.5 µg/rata produjo una disminución de efecto de 45.08 ± 10.31 % (n = 6) (p < 0.01) la que si fue estadísticamente diferente al suero. Las dosis superiores de 12.5 y 25.0 µg/rata también produjeron una disminución de la actividad nociceptiva con significancia estadística respecto a NaCl, disminuyendo la respuesta en 50.13 ± 3.06 % (n = 6) (p < 0.001) y 85.56 ± 7.85 % (n = 6) (p < 0.001) respectivamente (Fig. 7A y 8A). Se calculó la DE₅₀ la que fue de 11.051 µg/rata, con un intervalos de confianza al 95% entre 4.0549 y 30.1172 (Fig. 9A).

En la rata monoartrítica, la administración intratecal de (±) CPP produjo una disminución dosis-dependiente de la respuesta nociceptiva. La dosis de 0.125 µg/rata de (±) CPP produjo una disminución de efecto de 26.41 ± 7.32 % (n = 4) que no fue significativamente diferente del control. La dosis de 2.5 µg/rata produjo una disminución de efecto de 63.35 ± 3.94 % (n = 4) (p < 0.001) la que si fue estadísticamente diferente al suero. Las dosis superiores de 7.5, 12.5 y 25.0 µg/rata también produjeron una disminución de la actividad nociceptiva con significancia estadística respecto a NaCl, disminuyendo la respuesta en 80.28 ± 6.38 % (n = 4) (p < 0.001), 96.46 ± 1.72 % (n = 5) (p < 0.001) y 96.08 ± 2.14 % (n = 6) (p < 0.001) respectivamente (Fig. 7B y 8B). Se calculó la DE₅₀ la que fue de 0.731 µg/rata, con un intervalo de confianza al 95% de 0.4993 y 1.0706 (Fig. 9B).

4. Efecto antinociceptivo de la asociación ketamina/(±) CPP

En la rata normal, la administración intratecal de la combinación ketamina/(±) CPP 5 minutos antes de la capsaicina (1.5 µg) produjo una disminución dosis-dependiente de la respuesta nociceptiva. Las dosis de 0.029/0.023, 0.116/0.091, 0.463/0.366 y 0.926/0.731 µg/rata de ketamina/(±) CPP produjeron una disminución de efecto de $49.82 \pm 5.15 \%$ (n = 4) (p < 0.001), $72.95 \pm 15.25 \%$ (n = 4) (p < 0.001), $87.92 \pm 6.59 \%$ (n = 6) (p < 0.001) y $89.64 \pm 3.79 \%$ (n = 6) (p < 0.01) respectivamente (Fig. 10A y 11A). Se calculó la DE₅₀ la que fue de 0.040 µg/rata de ketamina/(±) CPP, con un intervalo de confianza al 95% de 0.0146 y 0.1093 (Fig. 12A).

En la rata monoatrica, la administración intratecal de la combinación ketamina y (±) CPP produjo también una disminución dosis-dependiente de la respuesta nociceptiva con las mismas dosis empleadas en las ratas normales. Estos resultados fueron $61.19 \pm 8.65 \%$ (n = 8) (p < 0.001), $70.85 \pm 5.81 \%$ (n = 6) (p < 0.001), $75.87 \pm 7.92 \%$ (n = 7) (p < 0.001) y $87.65 \pm 6.31 \%$ (n = 6) (p < 0.001) respectivamente (Fig. 10B y 11B). Se calculó la DE₅₀ la que fue de 0.011 µg/rata de ketamina/(±) CPP, con un intervalo de confianza al 95% de 0.002 y 0.061 (Fig. 12B).

5. Análisis isoblográfico de la asociación ketamina/(±) CPP.

La dosis efectiva 50 (DE₅₀) de la combinación ketamina/(±) CPP tanto en las ratas normales como en las monoartríticas produjo un efecto supra aditivo (Fig. 13A y 13B).

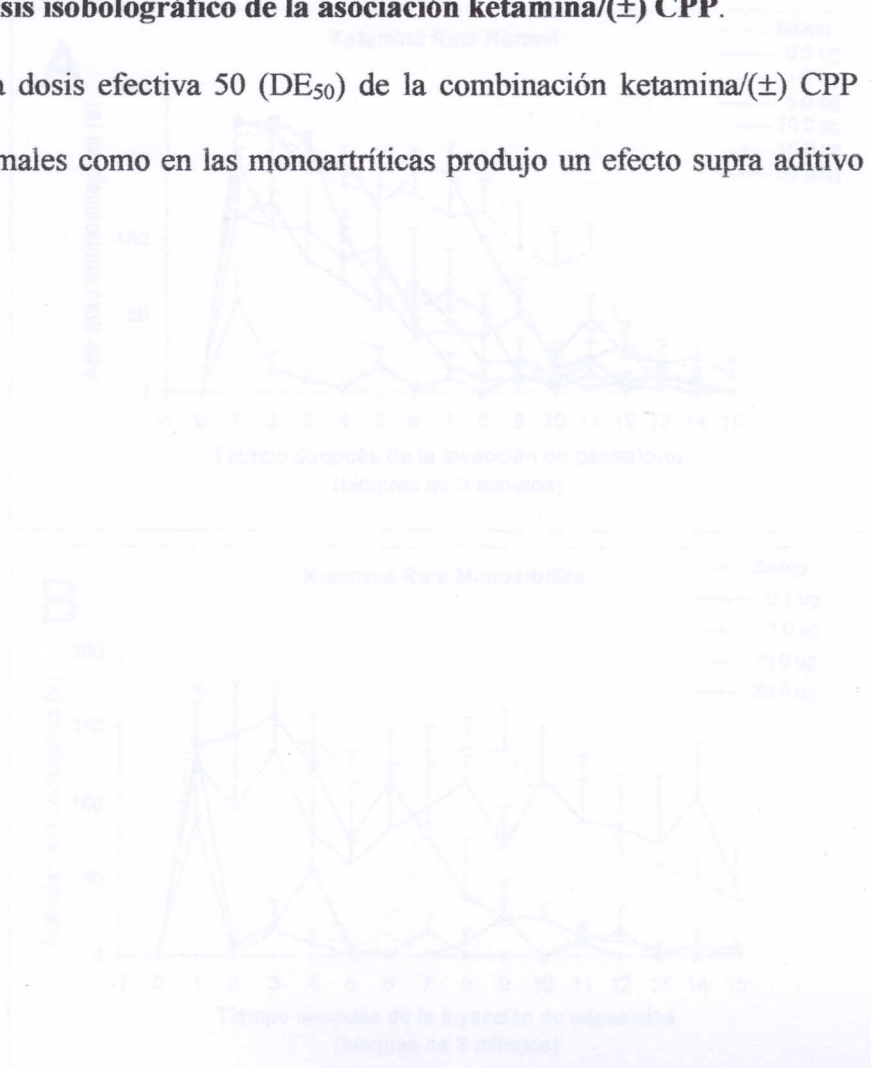


Figura 4

Curso temporal del efecto antinociceptivo de la administración intratecal de ketamina sobre la respuesta nociceptiva inducida por la inyección de capsaicina en la extremidad inferior en ratas normales (A) y monoartríticas (B) comparado a la administración de NaCl al 0.9%. Los valores están expresados como el promedio \pm SEM.

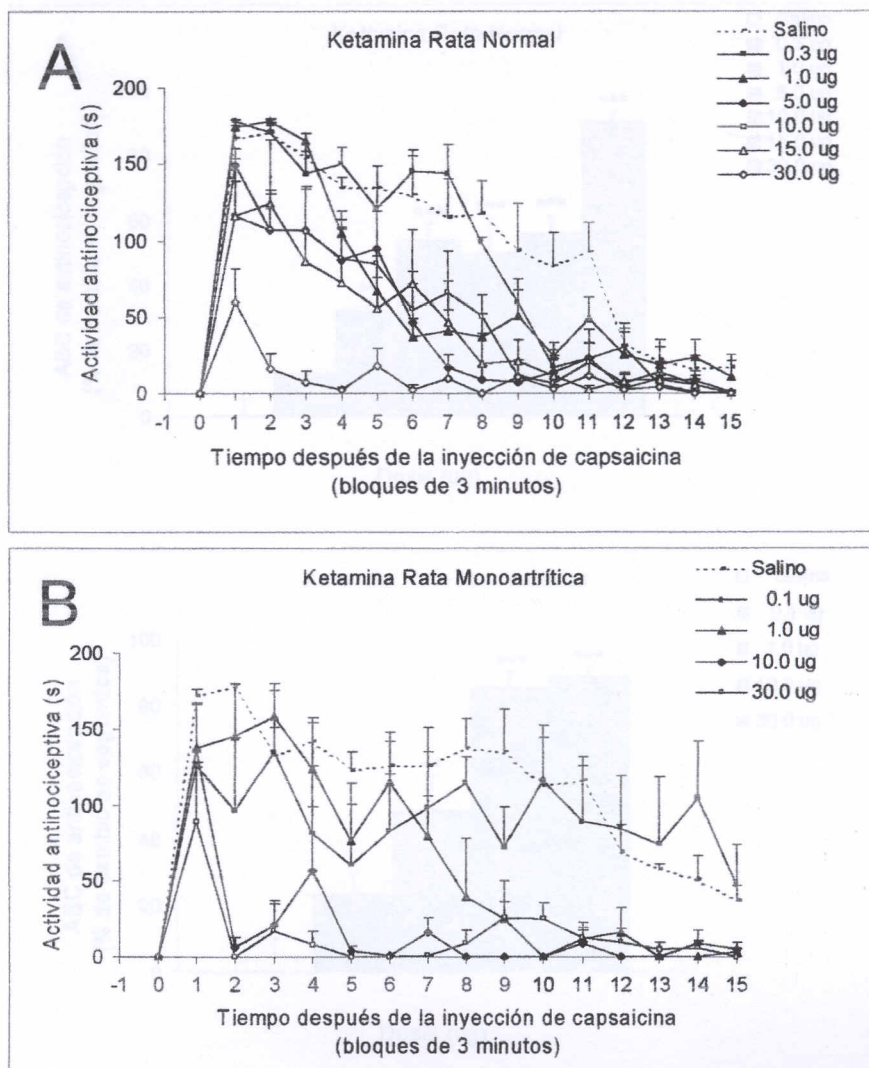


Figura 4

Curso temporal del efecto antinociceptivo de la administración intratecal de ketamina sobre la respuesta nociceptiva inducida por la inyección de capsaicina en la extremidad inferior en ratas normales (A) y monoartríticas (B) comparado a la administración de NaCl al 0.9%. Los valores están expresados como el promedio \pm SEM.

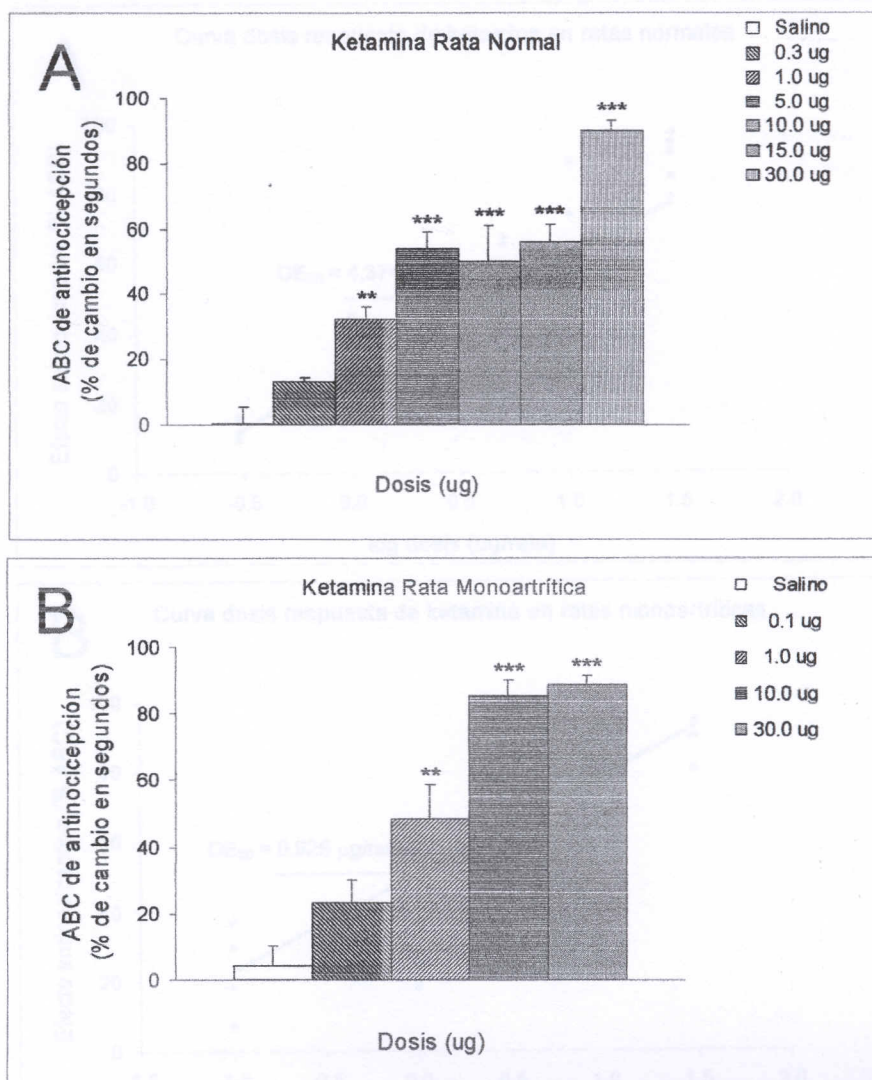


Figura 5

Área bajo la curva del efecto antinociceptivo de ketamina administrado en forma intratecal, sobre la respuesta inducida por la inyección de capsaicina en la extremidad inferior en ratas normales (A) y monoartríticas (B) comparado a la administración de NaCl al 0.9%. Las diferencias significativas entre las diferentes dosis de ketamina y el control están indicadas por asteriscos de acuerdo a la expresión de resultados.

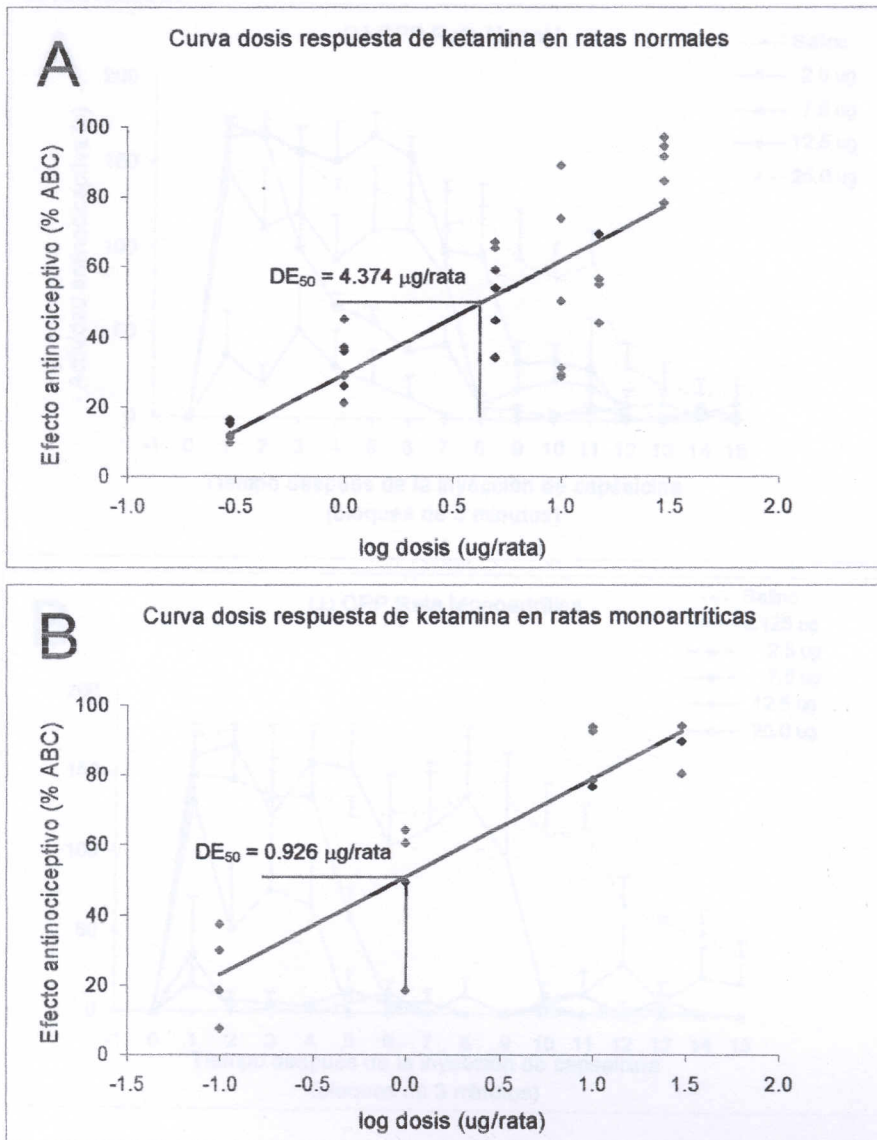


Figura 6

Curva dosis-respuesta del efecto antinociceptivo de ketamina administrado en forma intratecal, en ratas normales (A) y monoartríticas (B) expresado en logaritmo de la dosis. Se indica la DE_{50} de ketamina intratecal.

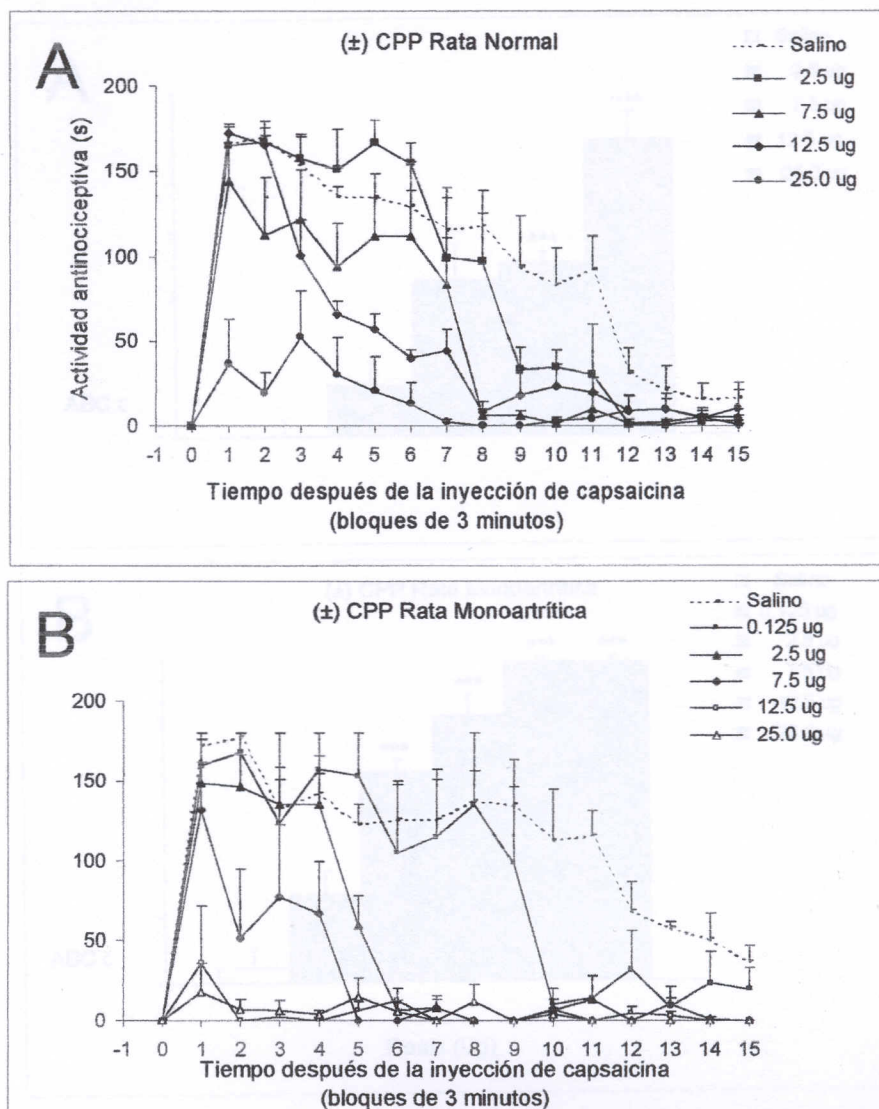


Figura 7

Curso temporal del efecto antinociceptivo de la administración intratecal de (±) CPP sobre la respuesta nociceptiva inducida por la inyección de capsaicina en la extremidad inferior en ratas normales (A) y monoartríticas (B) comparado a la administración de NaCl al 0.9%. Los valores están expresados como el promedio \pm SEM.

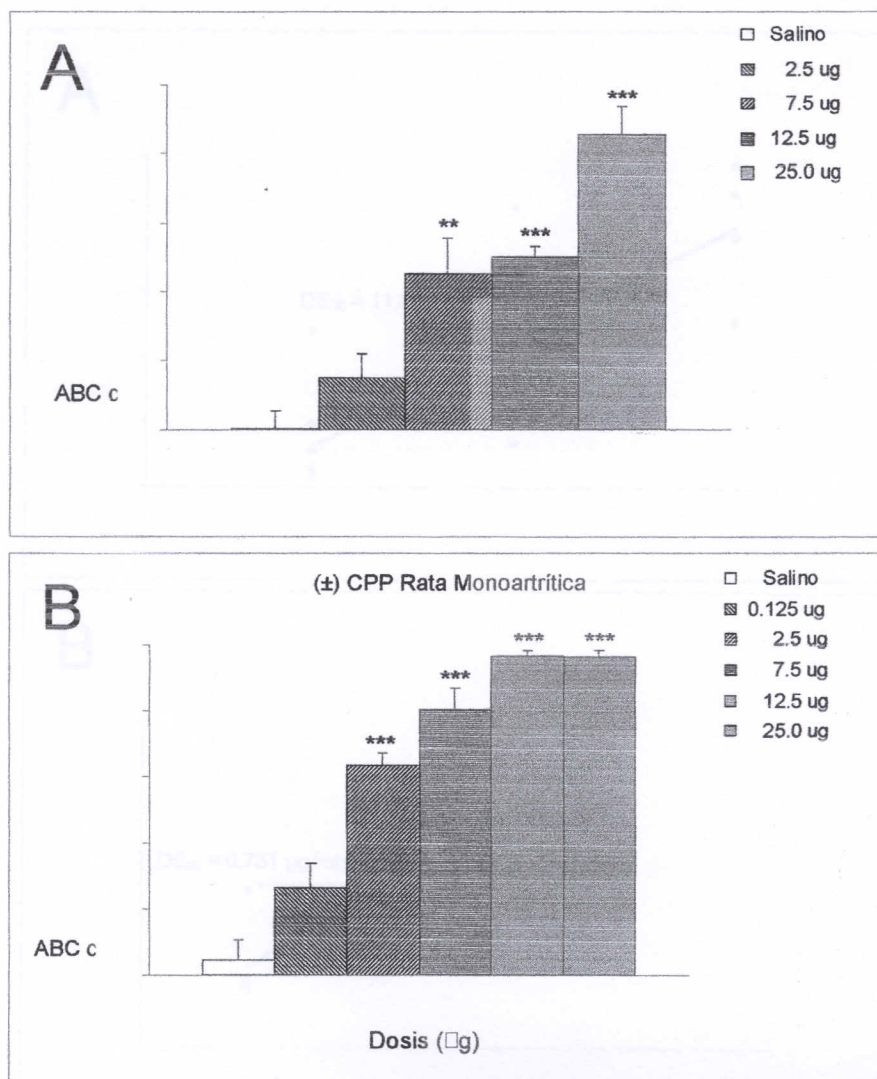


Figura 8

Área bajo la curva del efecto antinociceptivo de (±) CPP administrado en forma intratecal, sobre la respuesta inducida por la inyección de capsaicina en la extremidad inferior en ratas normales (A) y monoartríticas (B) comparado a la administración de NaCl al 0.9%. Las diferencias significativas entre las diferentes dosis de (±) CPP y el control están indicas por asteriscos de acuerdo a la expresión de resultados.

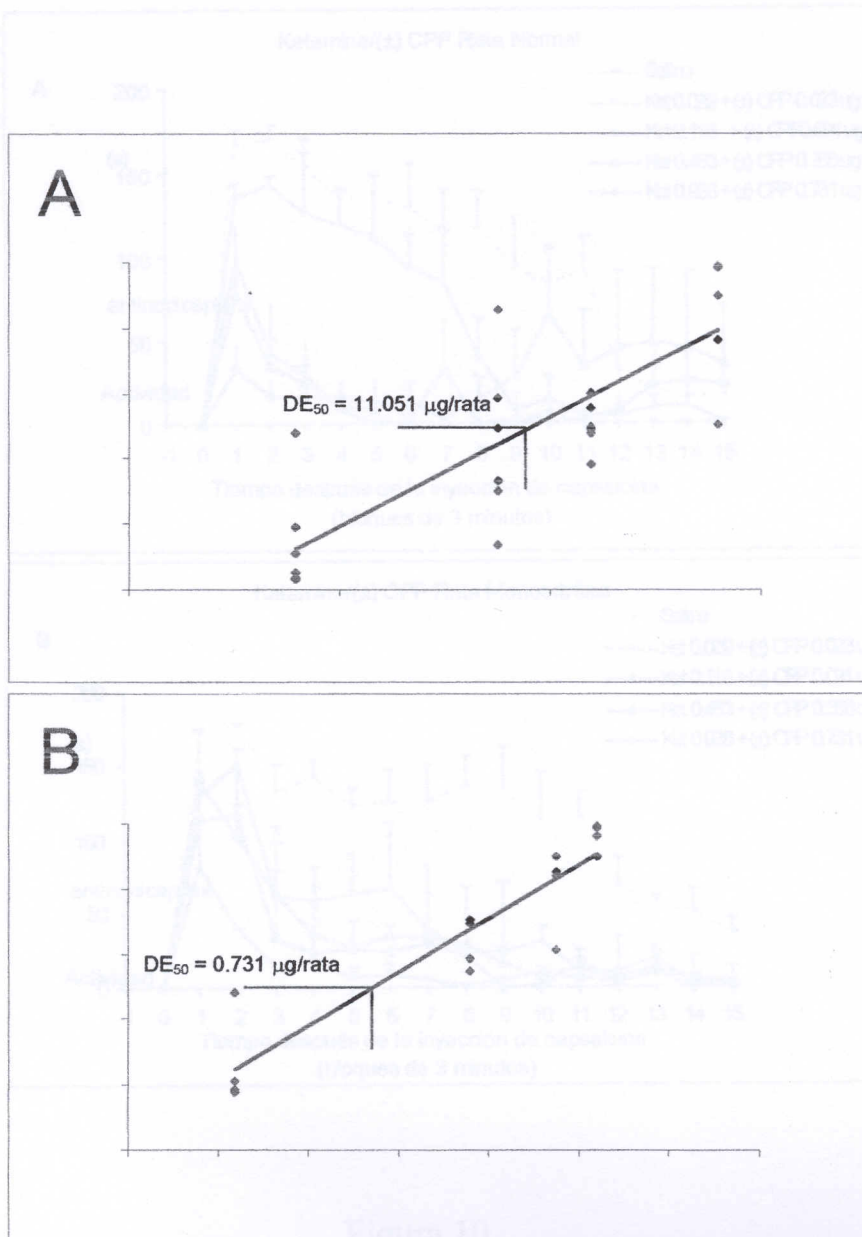


Figura 9

Curva dosis-respuesta del efecto antinociceptivo de (\pm) CPP administrado en forma intratecal, en ratas normales (A) y monoartríticas (B) expresado en logaritmo de la dosis. Se indica la DE₅₀ de (\pm) CPP intratecal.

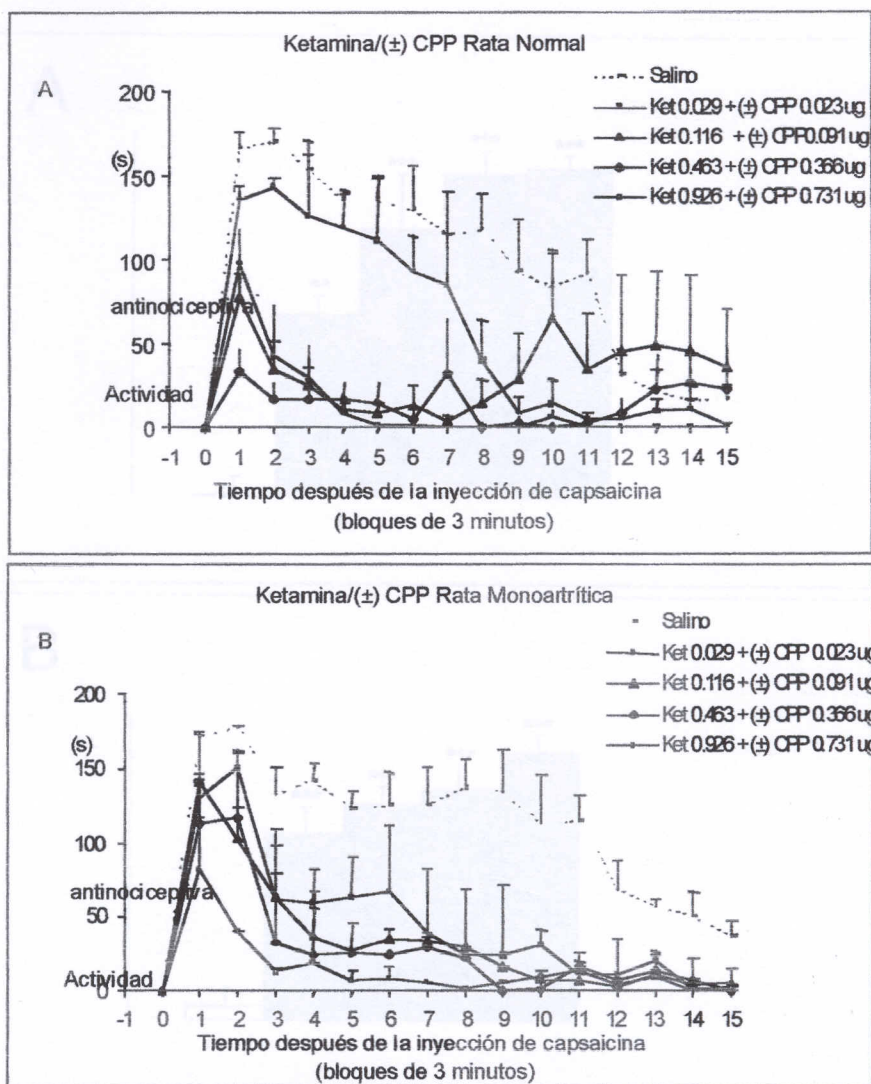


Figura 10

Curso temporal del efecto antinociceptivo de la administración intratecal de ketamina/(±) CPP sobre la respuesta nociceptiva inducida por la inyección de capsaicina en la extremidad inferior en ratas normales (A) y monoartríticas (B) comparado a la administración de NaCl al 0.9%. Los valores están expresados como el promedio \pm SEM.

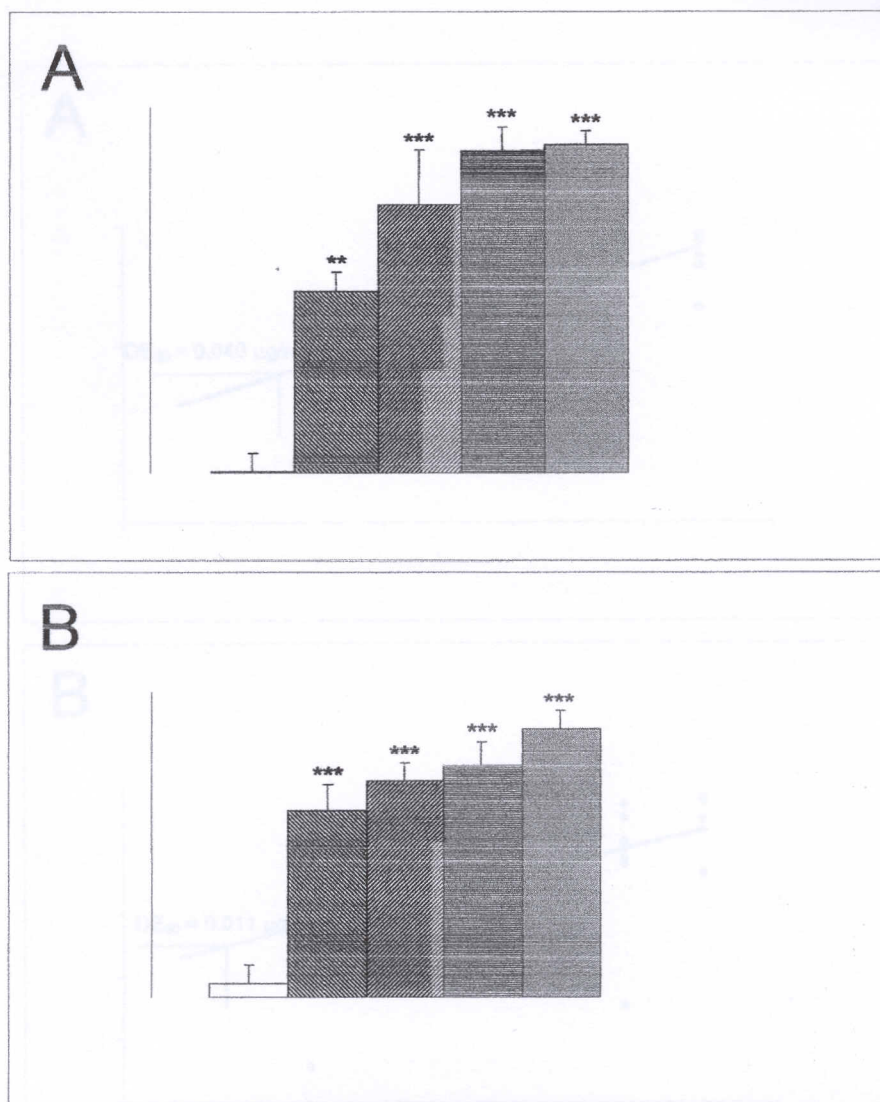


Figura 11

Área bajo la curva del efecto antinociceptivo de ketamina/(±) CPP administrado en forma intratecal, sobre la respuesta inducida por la inyección de capsaicina en la extremidad inferior en ratas normales (A) y monoartríticas (B) comparado a la administración de NaCl al 0.9%. Las diferencias significativas entre las diferentes dosis de ketamina/(±) CPP y el control están indicadas por asteriscos de acuerdo a la expresión de resultados.

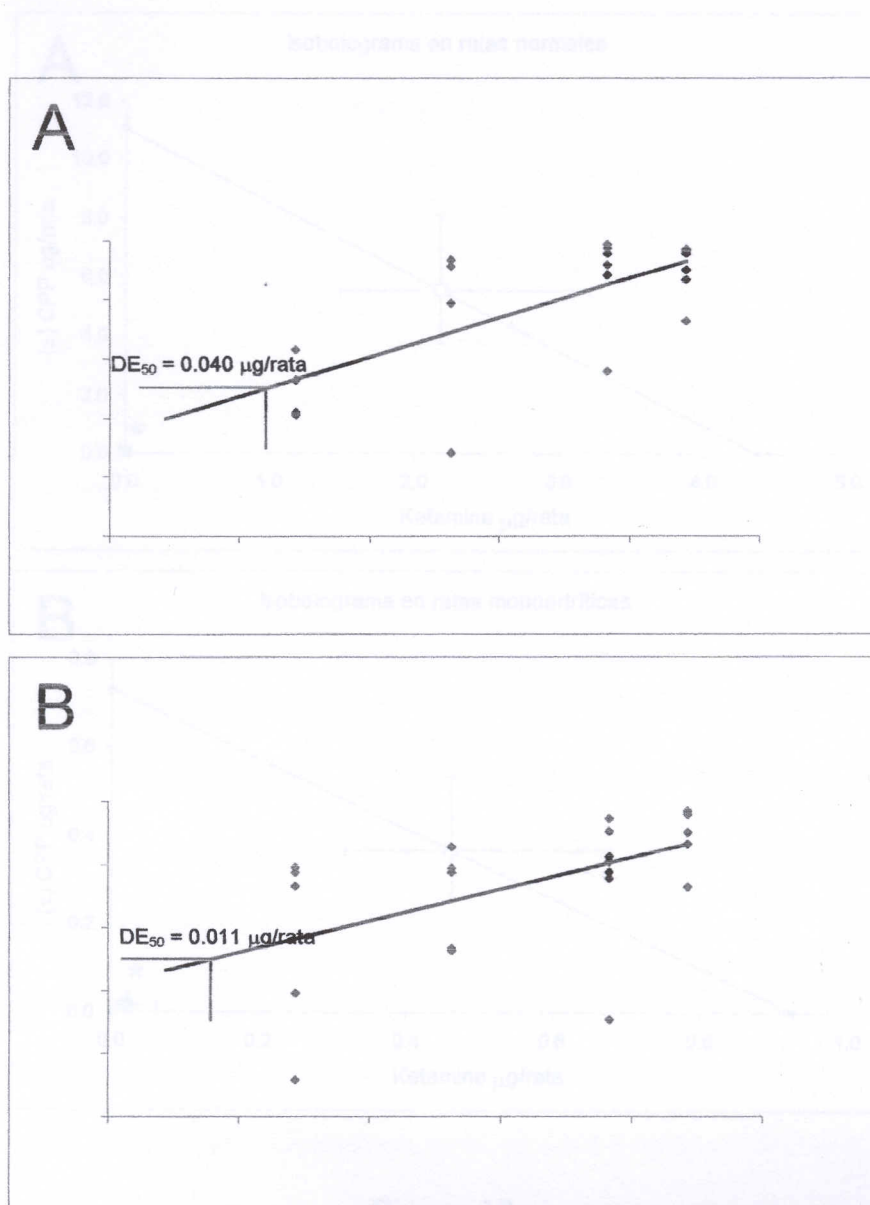


Figura 12

Curva dosis-respuesta del efecto antinociceptivo de ketamina/(±) CPP administrado en forma intratecal, en ratas normales (A) y monoartríticas (B) expresado en logaritmo de la dosis. Se indica la DE₅₀ de ketamina/(±) CPP intratecal.

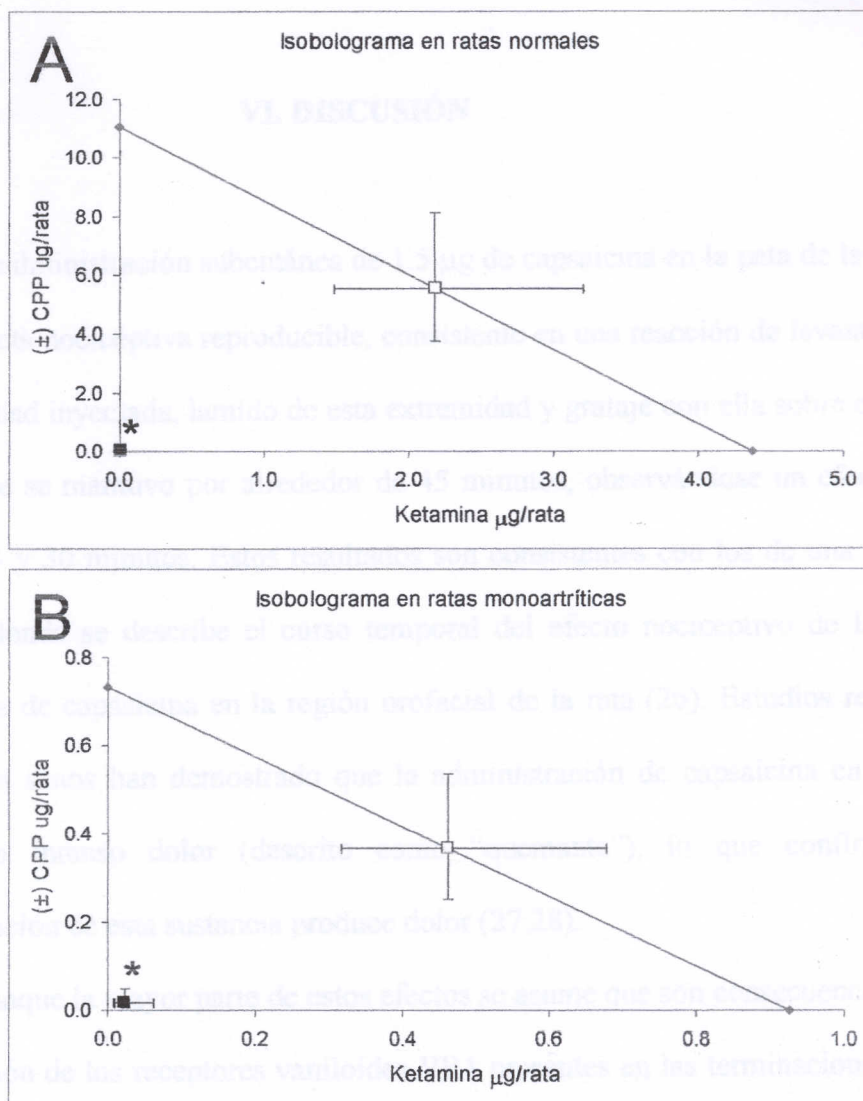


Figura 13

Isoblograma para la co-administración de ketamina y (±) CPP. El cuadrado cerrado corresponde al punto experimental con el límite de confianza del 95% y el cuadrado abierto corresponde al cálculo teórico del punto aditivo. Los límites de confianza para ambos puntos están graficados en los cuadrados correspondientes. El asterisco (*) representa una interacción supraaditiva con un $P < 0.05$ entre los puntos.

VI. DISCUSIÓN

La administración subcutánea de 1.5 μg de capsaicina en la pata de la rata indujo una conducta nociceptiva reproducible, consistente en una reacción de levantamiento de la extremidad inyectada, lamido de esta extremidad y grataje con ella sobre el cuerpo de la rata, que se mantuvo por alrededor de 45 minutos, observándose un efecto máximo entre los 3 y 30 minutos. Estos resultados son consistentes con los de una publicación reciente, donde se describe el curso temporal del efecto nociceptivo de la inyección subcutánea de capsaicina en la región orofacial de la rata (26). Estudios realizados en voluntarios sanos han demostrado que la administración de capsaicina en el humano induce un intenso dolor (descrito como "quemante"), lo que confirma que la administración de esta sustancia produce dolor (27,28).

Aunque la mayor parte de estos efectos se asume que son consecuencia directa de la activación de los receptores vaniloides VR1 presentes en las terminaciones nerviosas libres que reciben los estímulos dolorosos, parte de ellos pueden ser también producto de la estimulación de las terminaciones libres por sustancias algógenas liberadas localmente en el tejido subcutáneo por la capsaicina. En efecto, es posible que la administración subcutánea de capsaicina produzca liberación local de mediadores de la inflamación, tales como sustancia P, ácido glutámico, histamina, etc., sustancias con reconocido

poder algógeno y que pueden además contribuir a la generación de la hiperalgesia e hiperemia que acompañan al dolor inducido por la capsaicina (29,30).

En el test de capsaicina, la DE_{50} de ketamina cuando se administró por vía intratecal fue de 4.374 μg en la rata normal y de 0.926 μg en la rata monoartrítica, valores que son muy inferiores al requerido para inhibir en 50% el reflejo de la cola en ratas normales ($DE_{50} > 30 \mu\text{g}$) (31), lo que probablemente se debe a la diferente potencia que presenta este fármaco en dolor tónico y en dolor fásico. Respecto a ketamina, su acción analgésica principal está ligada a un bloqueo no competitivo del receptor NMDA, que como se sabe es el responsable de la mantención de la descarga neuronal a nivel espinal frente a un estímulo doloroso repetitivo, fenómeno denominado “wind up” (32). Esto apunta a un buen efecto analgésico de los bloqueadores no competitivos del receptor NMDA en el test de la capsaicina intraplantar.

Por su parte, la DE_{50} para (\pm) CPP intratecal fue de 11.051 μg en la rata normal y de 0.731 μg en la rata monoartrítica, valores que son superiores a las dosis intratecales utilizadas para obtener antinocicepción en el test de formalina en la rata normal (0.1 y 0.3 $\mu\text{g}/\text{rata}$), otro test de dolor tónico (33). (\pm) CPP, como se sabe, ejerce su acción principal a través de un efecto competitivo con glutamato en el sitio de reconocimiento del neurotransmisor en el receptor NMDA (21). Estudios previos realizados en ratón han mostrado efectos inconsistentes de (\pm) CPP en dolor inducido por capsaicina, ya que en uno de estos estudios (34) no se encontró acción antinociceptiva después de la

administración intratecal de 2 - 5 μg de (\pm) CPP, mientras que en otro estudio (35) se logró demostrar una acción antinociceptiva de (\pm) CPP i.t., con una DE_{50} de 0.3 μg en esta especie animal. Los presentes resultados muestran que (\pm) CPP produce un efecto dosis-dependiente consistente y del mismo orden de magnitud que ketamina.

Estudios previos han señalado que la ketamina inyectada por vía subcutánea produce un efecto antinociceptivo dosis-dependiente en las ratas sometidas al test de la capsaicina intraplantar (36), resultados que complementan los obtenidos en el presente estudio. La DE_{50} de ketamina subcutánea, interesantemente, fue sólo de 0.213 mg/kg en el test de la capsaicina intraplantar a diferencia del obtenido en la capsaicina orofacial que fue de 3.21 mg/kg, diferencia que podría representar una mayor proporción de fibras nociceptivas C en la inervación de la extremidad posterior comparada a la región orofacial. Esta baja dosis de ketamina necesaria para reducir en un 50% el efecto pronociceptivo de capsaicina en la extremidad inferior también contrasta con el menor efecto antinociceptivo de este fármaco en tests de dolor fásico, como el reflejo de la cola en la rata, donde es necesario dosis mayores de 10 mg para lograr alrededor de un 50% de analgesia (14). La mayor potencia analgésica de ketamina en el test de la capsaicina (dolor tónico) que en el test del reflejo de la cola (dolor fásico), está probablemente relacionada con la capacidad de este fármaco para inhibir la persistencia del dolor, a través del bloqueo del receptor NMDA, característica esencial del dolor tónico.

Es interesante señalar que tanto ketamina como (\pm) CPP, administrados por vía intratecal, fueron significativamente más efectivos en los animales monoartríticos que en los normales. Estos resultados son concordantes con la noción que el receptor NMDA juega un rol relevante en dolor crónico pero no en dolor agudo. En efecto, en dolor agudo breve se activan principalmente los receptores AMPA, que son insensibles a estos bloqueadores. En dolor persistente se activan los receptores NMDA, razón por la cual estos fármacos serían útiles para el tratamiento de cuadros dolorosos de tipo crónico. Esta explicación es apoyada por resultados recientes que señalan que estos mismos fármacos ejercen un pobre efecto antinociceptivo en el test de presión de la pata en ratas, un test de dolor fásico donde el estímulo doloroso es de corta duración (37).

No obstante que los antagonistas NMDA mostraron mayor eficacia en las ratas con dolor crónico cuando se administraron individualmente, al asociarlos en dosis bajas los resultados en ambos tipos de animales fueron similares. En efecto, el análisis isobolográfico indicó que la asociación ketamina/(\pm) CPP fue supra-aditiva tanto en las ratas normales como en los animales monoartríticos. Esto significa que la combinación de dos fármacos que actúan en sitios distintos del receptor NMDA, en ratas con y sin dolor crónico, produce una acción mayor que la esperada por una simple adición de efectos, lo que constituye un hallazgo relevante que podría repercutir en futuras aplicaciones de orden clínico. En efecto, la característica de supra-aditividad que muestran ketamina y (\pm) CPP en dolor crónico experimental, extrapolada al humano y

extrapolada a la administración sistémica, podría significar una reducción considerable de las dosis de cada fármaco necesarias para inducir analgesia, lo que disminuiría los efectos colaterales psicodislépticos a niveles quizás tolerables. Ciertamente, se requiere de investigación clínica significativa para comprobar esta hipótesis, así como estudiar en detalle las diversas asociaciones de fármacos que modulan los receptores NMDA con el objeto de optimizar la analgesia y disminuir las reacciones adversas.



VII. CONCLUSIONES

1. El test de capsaicina intraplantar presenta elevada sensibilidad a ketamina y (\pm) CPP en las ratas normales ($ED_{50} = 4.374$ y $11.051 \mu\text{g}$, respectivamente). Esta observación indica que los nociceptores que poseen receptores vaniloides VR-1 utilizan glutamato como neurotransmisor principal.
2. Las ratas monoartríticas muestran una sensibilidad incrementada a ketamina y (\pm) CPP en relación a las ratas normales ($ED_{50} = 0.926$ y $0.731 \mu\text{g}$, respectivamente), lo que sugiere que en monoartritis experimental se privilegia la nocicepción mediada por receptores NMDA en las fibras C.
3. La asociación ketamina/(\pm)CPP muestra efectos antinociceptivos supra-aditivos en el test de capsaicina tanto en ratas normales ($ED_{50} = 0.040 \mu\text{g}$) como monoartríticas ($ED_{50} = 0.011 \mu\text{g}$), lo que sugiere que la combinación de antagonistas competitivos del sitio de glutamato con bloqueadores del canal del receptor NMDA puede representar una estrategia terapéutica válida para enfrentar en la clínica episodios de dolor tónico de origen químico/inflamatorio

VIII. SUGERENCIAS

De este estudio se desprenden las siguientes líneas de proyección:

- Estudiar otros fármacos que modulen los otros sitios del receptor NMDA, para investigar si también se puede obtener efecto antinociceptivo mediante antagonistas de esos sitios.
- Realizar un estudio isoblográfico de estos nuevos fármacos con los ya estudiados para evaluar si el efecto de su asociación es aditivo o supra-aditivo, con el objeto de poder reducir las dosis y de esa manera evitar los efectos colaterales no deseados.
- También es necesario realizar estudios electrofisiológicos e inmunohistoquímicos con estos mismos fármacos, para comprender mejor las bases celulares y moleculares de sus mecanismos de acción.

REFERENCIAS RESUMEN GRÁFICAS

El receptor NMDA puede ser funcionalmente modulado por ligandos que actúan en diversos sitios del receptor. En el presente estudio se investigó si la asociación de ketamina (bloqueador no competitivo del receptor) con (\pm) CPP (bloqueador competitivo del sitio de glutamato) administrados por vía intratecal produce sinergia en ratas normales y monoartríticas frente a nocicepción química. Se utilizaron ratas Sprague-Dawley macho adultas a las que se les indujo monoartritis mediante la administración intra-articular de adyuvante de Freund completo, y la nocicepción química fue evaluada mediante el test de administración intraplantar de capsaicina (1.5 μ g/25 μ L). Como controles se utilizaron ratas normales. Los resultados mostraron que tanto en las ratas normales como monoartríticas los fármacos indujeron un efecto antinociceptivo dosis-dependiente: ketamina (DE_{50} = 4.37 μ g/rata normal; DE_{50} = 0.93 μ g/rata monoartrítica), (\pm)CPP (DE_{50} = 11.05 μ g/rata normal; DE_{50} = 0.73 μ g/rata monoartrítica). Igualmente, la asociación ketamina/(\pm)CPP mostró un efecto supra-aditivo tanto en las ratas normales como monoartríticas (DE_{50} = 0.04 μ g/rata normal; DE_{50} = 0.01 μ g/rata monoartrítica). Se concluye que la asociación estudiada es supra-aditiva en dolor de tipo químico, lo que podría deberse a que el receptor vaniloide VR-1 está presente esencialmente en nociceptores tipo C, fundamentales en este tipo de dolor.

Trabajo de investigación financiado por Proyecto FONDECYT 1040873.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bonica, J.J. The management of pain. 2 ed. Philadelphia, Lea & Febiger, v.1, p. 958, 1990.
2. Paeile, C., Bilbeny, N. El Dolor: aspectos básicos y clínicos. 3ra ed. Santiago, Mediterráneo, 2005.
3. Millan, M. The induction of pain: an integrative review. Prog. Neurobiol. 57: 1-164. 1999.
4. Hansen, B., Hardie, E. Measurement modalities. En: Thalhammer, J.G; Short, C.E. Eds. Proceedings of Do Animals Have Pain?, an official satellite symposium of the 9th World Congress on Pain. Vienna, AT. p. 5, 1999.
5. Tranquilli, W. Perioperative analgesia. Proceedings of IVECCS VI, San Antonio, Texas, p. 68, 1998.
6. Dallel, R., Pelissier, T. Capsaicina: Propiedades farmacológicas y terapéuticas. El Dolor 35: 7-15, 2001.
7. Coderre, T., Basbaum, A., Levine, J. Neural control of vascular permeability: interactions between primary afferents, mast cells, and sympathetic efferents. J. Neurophysiol. 62: 48-58, 1989.

8. Heller, P., Green, P., Tanner, K., Miao, F., Levine, J. Peripheral neural contributions to inflammation. En: Fields, H., Liebeskind, J. Eds. Progress in Pain Research and Management. Seattle, IASP Press. p. 31, 1994.
9. Parsons, C.G. NMDA receptors as targets for drug action in neuropathic pain. Eur. J. Pharmacol. 429: 71-78, 2001.
10. Chizh, B.A. Novel approaches to targeting glutamate receptors for the treatment of chronic pain: Review article. Amino Acids 23: 169-176, 2002.
11. Imagen del receptor NMDA adaptada de <http://images.google.cl/images?q=receptor+NMDA&hl=es&btnG=B%C3%BAsqueda+de+im%C3%A1genes>
12. Turski, L. N-methyl-D-aspartate receptor complex. Different sites for regulation and clinical consequences. Arzneim. Forsch. Drug Res. 40: 511-514, 1990.
13. Lipton, S.A., Rosenberg, P.A. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. N. Engl. J. Med. 330: 613-622, 1994.
14. Hewitt, D.J. The use of NMDA-receptor antagonists in the treatment of chronic pain. Clin. J. Pain 16 Suppl: S73-S79, 2000.
15. Anis, N.A., Berry, S.C., Burton, N.R., Lodge, D. The dissociative anaesthetics, ketamine and phencyclidine, selectively reduce excitation of central mammalian neurones by *N*-methyl-aspartate. Br. J. Pharmacol. 79: 565-575, 1983.

16. Thommson, A.M., West, D.C., Lodge, D. An *N*-methyl aspartate receptor-mediated synapse in a rat cerebral cortex: a site of action of ketamine? *Nature* 313: 479-481, 1985.
17. Dickenson, A.H. NMDA receptor antagonists: interactions with opioids. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 41: 112-115, 1997.
18. Zhuo, M. NMDA receptor-dependent long term hyperalgesia after tail amputation in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 349: 211-220, 1998.
19. Chia, Y.Y., Liu, K., Liu, Y.C., Chang, H. C. Wong, C.S. Adding ketamine in a multimodal patient-controlled epidural regimen reduces postoperative pain and analgesic consumption. *Anesth. Analg.* 86: 1245-1249, 1998.
20. Suzuki, M., Tsueda, K., Lansing, P.S., Tolan, M.M., Fuhrman, T.M., Ignacio, C.I., Sheppard, R.A. Small-dose ketamine enhances morphine-induced analgesia after outpatient surgery. *Anesth. Analg.* 89: 98-103, 1999.
21. Harris, E.W., Ganong, A.H., Monaghan, D.T, Watkins, J.C., Cotman, C.W. Action of 3-((+/-)-2-carboxypiperazin-4-yl)-propyl-1-phosphonic acid (CPP): a new and highly potent antagonist of N-methyl-D-aspartate receptors in the hippocampus. *Brain Res.* 382: 174 – 177, 1986.
22. Woolf, C.J, Thompson, S.W. The induction and maintenance of central sensitization is dependent on N-methyl-D-aspartic acid receptor activation;

- implications for the treatment of post-injury pain hypersensitivity states. *Pain* 44: 293-299, 1991.
23. Butler SH, Godefroy F, Besson JM, Weil-Fugazza J. A limited arthritic model for chronic pain studies in the rat. *Pain* 48:73-81, 1992.
24. Mestre, C., Pelissier, T., Fialip, J., Wilcox, G., Eschalier, A. A method to perform direct transcutaneous intrathecal injection in rats. *J. Pharmacol.Toxicol. Methods*. 32: 197-200,1994.
25. Tallarida, R.J., 2000. Drug synergism and dose-effect data analysis. Boca Raton, Chapman Hall/CRC Press, pp 57-75.
26. Pelissier, T., Pajot, J. and Dallel, R. The orofacial capsaicin test in rats: effects of different capsaicin concentrations and morphine. *Pain* 96:81-87, 2002.
27. Ngom, P.I., Dubray, C., Woda, A. and Dallel, R. A human oral capsaicin pain model to assess topical anesthetic-analgesic drugs. *Neurosci Lett* 316:149-152, 2001.
28. Balaban, C.D., McBurney, D.H. and Affeltranger, M.A. Three distinct categories of time course of pain produced by oral capsaicin. *J. Pain* 6:315-322, 2005.
29. Lundblad L, Lundberg JM, Anggard A, Zetterstrom O. Capsaicin-sensitive nerves and the cutaneous allergy reaction in man. Possible involvement of sensory neuropeptides in the flare reaction. *Allergy* 42:20-25, 1987.

30. Simone, D.A., Baumann, T.K., LaMotte, R.H. Dose-dependent pain and mechanical hyperalgesia in humans after intradermal injection of capsaicin. *Pain*. 38:99-107, 1989.
31. Joo, G., Horvath G., Klimscha, W., Kekesi, G., Dobos, I., Szikszay, M., Benedek, G. The effects of ketamine and its enantiomers on the morphine- or dexmedetomidine-induced antinociception after intrathecal administration in rats. *Anesthesiology* 93: 231-241, 2000.
32. Herrero, J.F, Laird, J.M, Lopez-Garcia, J.A. Wind-up of spinal cord neurones and pain sensation: much ado about something? *Prog Neurobiol*. 61:169-203, 2000.
33. Kristensen, J.D., Karlsten, R., Gordh, T., Berge, O.G. The NMDA antagonist 3-(2-carboxypiperazin-4-yl)propyl-1-phosphonic acid (CPP) has antinociceptive effect after intrathecal injection in the rat. *Pain* 56: 59-67, 1994.
34. Sun, X., Larson, A.A. MK-801 inhibits the effects of capsaicin in the adult mouse by an action involving phencyclidine (PCP) sites not linked to NMDA activity. *NeuroReport* 4: 1147-1150, 1993.
35. Sakurada, T., Manome, Y., Tan-No, K., Matsunaga, Y., Sakurada, S., Kisara, K. Possible involvement of the spinal substance P system in pilocarpine-induced scratching in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 59: 339-345, 1998.

36. Pelissier, T., De Lapeyra, C., Paeile, C., Infante, C., Hernández A. Efecto antinociceptivo comparativo de ketamina en los tests de capsaicina oral e intraplantar en la rata. XXVI Reunión Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile, Quinamávida, 3-5 Octubre 2004.
37. Hernández, A., De Lapeyra, C., Constandil, L., Infante, C., Pelissier, T. Efecto antinociceptivo de D-CPP, antagonista competitivo del receptor NMDA, en el test de capsaicina intraplantar en la rata. XXVI Reunión Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile, Quinamávida, 3-5 Octubre 2004.